



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARIANA BORGES COSTA BRIOSCHI

DA ENTRADA DE ÁCIDOS GRAXOS AO EFLUXO DE
COLESTEROL: PROTEÍNAS MODULADAS NA INFECÇÃO
POR ESPÉCIES DE *LEISHMANIA*

CAMPINAS

2025

MARIANA BORGES COSTA BRIOSCHI

**DA ENTRADA DE ÁCIDOS GRAXOS AO EFLUXO DE COLESTEROL:
PROTEÍNAS MODULADAS NA INFECÇÃO POR ESPÉCIES DE
*LEISHMANIA***

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de **Doutora em Biologia Animal na área de Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia.***

Orientador: DANILO CICCONE MIGUEL

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA MARIANA BORGES COSTA BRIOSCHI, E ORIENTADA PELO PROF. DR. DANILO CICCONE MIGUEL.

**CAMPINAS
2025**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B772d Brioschi, Mariana Borges Costa, 1994-
Da entrada de ácidos graxos ao efluxo de colesterol : proteínas moduladas na infecção por espécies de *Leishmania* / Mariana Borges Costa Brioschi. – Campinas, SP : [s.n.], 2025.

Orientador: Danilo Ciccone Miguel.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. Ácidos graxos. 2. Infecção. 3. *Leishmania*. 4. Leishmaniose tegumentar americana. 5. Proteínas de ligação a ácido graxo. I. Miguel, Danilo Ciccone, 1984-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. III. Título.

Informações complementares

Título em outro idioma: From fatty acid uptake to cholesterol efflux : proteins modulated during infection by *Leishmania* species

Palavras-chave em inglês:

Fatty acids

Infection

Leishmania

Leishmaniasis, Cutaneous

Fatty acid-binding proteins

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

Titulação: Doutora em Biologia Animal

Banca examinadora:

Danilo Ciccone Miguel [Orientador]

Fernanda Janku Cabral

Fernanda de Freitas Anibal

Beatriz Simonsen Stolf Carboni

Ana Claudia Trocoli Torrecilhas

Data de defesa: 18-06-2025

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)

ODS: 3. Saúde e bem-estar

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-6420-2873>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9738570870852614>

COMISSÃO EXAMINADORA

Danilo Ciccone Miguel

Fernanda Janku Cabral

Fernanda de Freitas Anibal

Beatriz Simonsen Stolf Carboni

Ana Claudia Trocoli Torrecilhas

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do **Programa Biologia Animal na área de Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia** do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP.

Dedico esta tese à Deus e ao meu
esposo, Ricardo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus! Foi Ele quem me sustentou durante os momentos mais difíceis, e olha que tive muitos... Obrigada por Sua presença, cuidado e amor.

Agradeço meus pais, Maria e Marcelo, que se esforçaram muito para que eu chegasse até aqui. Foram muitos sacrifícios para que eu tivesse uma boa educação e a possibilidade de ingressar em uma universidade pública. Eu jamais estaria aqui sem vocês!

Ao meu amado esposo, Ricardo! Nos casamos um pouco depois do início do meu Doutorado, exatamente 1 mês após o início da quarentena. Não foi como planejamos, mesmo assim foi maravilhoso e cheio de significado. Além disso, o Rick trabalhou na linha de frente do COVID-19 e eu pude ajudá-lo neste momento. Infelizmente ficamos distantes dos nossos pais, mas foi uma forma de amá-los.

Graças a Deus os cientistas do mundo lutaram contra o tempo e desenvolveram uma vacina! Entretanto, deixo meus sentimentos às milhares de pessoas que perderam seus entes queridos. Foi um período difícil e sombrio.

Agradeço aos meus sogros, que ficaram mais próximos e me ajudaram nestes anos de dedicação.

Agradeço a minha irmã, Mayara, que nunca me deixou sozinha. Sempre estava disposta a conversar e me encontrar!

Agradeço imensamente ao meu orientador, Danilo! Sem você, esta tese não existiria. Sou grata por sua orientação, pela confiança e por estar junto nos meus momentos de desespero, quando os experimentos davam errado. Obrigada por me ajudar a desenvolver um pensamento crítico e por minha formação profissional. Obrigada pelos momentos de risada e pausas para o café! Obrigada por sua amizade!

Agradeço aos meus amigos do LEBIL: Marcus, Virlânio (com acento), Letícia, Karen, Ayra, Amanda e tantos outros alunos que ficaram, pelo menos um pouco, nos acompanhando e ajudando! E um agradecimento especial à Fernanda, cuja passagem foi breve, mas me indicou a pessoa que doou a Panqueca, minha cachorrinha carinhosa e companheira!

Desde o mestrado, a Letícia e a Karen estavam presentes. Tivemos altos e baixos, mas estamos aqui! Obrigada pela companhia no Belo, dividindo uma porção

grande de batatas fritas! Agradeço a Karen, que me ajudou nos momentos de choro. Agradeço a Letícia, pelas discussões científicas e companheirismo!

Marcus e Virlânio... O que dizer? Que surpresa boa no LEBIL, aprendi muito com vocês e ganhei amigos. Obrigada por tudo!

Agradeço aos professores do Departamento de Parasitologia: Marlene, Silmara, Fernanda, Adriano e Patrícia. Marlene, obrigada pelos docinhos e carinho! Foi um privilégio trabalhar e aprender com a senhora!

Agradeço à Fernanda Cabral e à Fernanda Gadelha por me ensinarem Western Blot e por estarem sempre disponíveis para tirar dúvidas! Vocês são sensacionais!

Quero agradecer aos amigos que ficaram mais próximos neste final: Elisama e Daniel! Foram anos difíceis, porém mesmo diante das dificuldades vocês nunca nos deixaram! Eu amo muito vocês e sou grata a Deus por nos aproximar de novo. Vocês não têm ideia da diferença que fazem na minha vida!

Às minhas amigas da UFSCar: Isabella, Lívia e Gabrielle! Queria vocês ao meu lado, mas fico muito feliz por, mesmo distantes, continuarmos essa amizade tão incrível! Muito obrigada!

Quero deixar também um agradecimento especial à Luciana, minha psicóloga, e à Dra. Renata, minha psiquiatra. Sem vocês eu já teria desistido. Apenas, obrigada!

E muito obrigada minhas lindas filhas, Panqueca e Amora. É incrível chegar em casa e ser recebida com festa, “lambeijos” e carinho! Adotem, é maravilhoso!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Porque dEle, e por meio dEle, e para Ele são
todas as coisas. A Ele, pois, a glória
eternamente. Amém!

Rm 11:36

RESUMO

As proteínas ligantes de ácidos graxos (FABPs), especialmente a do tipo 4 (FABP4), desempenham papéis centrais na regulação do metabolismo lipídico e na modulação da resposta imune em macrófagos, que são células-chave na infecção por *Leishmania*. Considerando a importância dessas células no controle da infecção, este estudo investigou o papel da FABP4 no contexto da leishmaniose cutânea, utilizando infecções *in vitro* com *Leishmania amazonensis* e *L. braziliensis*, bem como um modelo *in vivo* para *L. amazonensis*. Essas duas espécies são de alta relevância no Brasil, onde estão entre as principais causadoras da forma cutânea da doença, apresentando características clínicas e imunopatológicas distintas. Avaliamos a expressão de genes associados a vias de sinalização relacionadas à FABP4 por RT-PCR, além da análise de proteínas e metabólitos celulares. Nossos dados indicam que a ausência de FABP4 modula significativamente a expressão gênica e proteica em macrófagos infectados, promovendo acúmulo de lipídios e favorecendo vias como a lipogênese, enquanto suprime a glicólise — alterações metabólicas que podem beneficiar a sobrevivência do parasita. Nos modelos *in vivo*, observamos uma tendência à polarização da resposta imune para o perfil Th2 em animais deficientes em FABP4, em contraste com a resposta Th1 típica de macrófagos selvagens. Já nas infecções com *L. braziliensis*, embora algumas respostas se assemelhem às observadas com *L. amazonensis*, diferenças importantes sugerem que o papel da FABP4 pode variar conforme a espécie de *Leishmania*. No conjunto, nossos achados indicam que a FABP4 contribui para conter a infecção por meio da ativação imune e do controle do metabolismo lipídico, sendo sua ausência associada a um ambiente mais permissivo à replicação do parasita. Esses resultados apontam a FABP4 como um potencial alvo terapêutico ou marcador prognóstico nas leishmanioses, especialmente nas formas cutâneas prevalentes no Brasil.

Palavras-chave: ácidos graxos; infecção; *Leishmania*; leishmaniose cutânea; proteínas ligantes de ácidos graxos.

ABSTRACT

Fatty acid-binding proteins (FABPs), particularly type 4 (FABP4), play central roles in regulating lipid metabolism and modulating immune responses in macrophages, which are key target cells during *Leishmania* infection. Given the importance of macrophages in controlling the infection, this study investigated the role of FABP4 in the context of cutaneous leishmaniasis, using in vitro infections with *Leishmania amazonensis* and *L. braziliensis*, as well as an in vivo model for *L. amazonensis*. These two species are highly relevant in Brazil, where they are among the main causative agents of the cutaneous form of the disease, presenting distinct clinical and immunopathological features. We evaluated the expression of genes associated with signaling pathways related to FABP4 by RT-PCR, along with protein and cellular metabolite analysis. Our data indicate that the absence of FABP4 significantly modulates gene and protein expression in infected macrophages, promoting lipid accumulation and favoring pathways such as lipogenesis, while suppressing glycolysis—metabolic alterations that may support parasite survival. In vivo models revealed a trend toward Th2 immune polarization in FABP4-deficient animals, in contrast to the Th1 profile typically observed in wild-type macrophages. In infections with *L. braziliensis*, although some responses were similar to those seen with *L. amazonensis*, key differences suggest that the role of FABP4 may vary depending on the *Leishmania* species. Overall, our findings indicate that FABP4 contributes to infection control through immune activation and regulation of lipid metabolism, while its absence creates a more permissive environment for parasite replication. These results highlight FABP4 as a potential therapeutic target or prognostic marker in leishmaniasis, particularly in the cutaneous forms prevalent in Brazil.

Keywords: fatty acids; infection; *Leishmania*; cutaneous leishmaniasis; fatty acid-binding proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo representativo de <i>Leishmania amazonensis</i>	18
Figura 2: Alteração nas fontes de carbono utilizadas pela forma promastigota (esquerda) e amastigota (direita) de <i>Leishmania</i>	22
Figura 3: Proteínas moduladas pela FABP4.....	25
Figura 4: Genotipagem de camundongos C57/BL6.....	42
Figura 5: Níveis de transcritos dos genes investigados em macrófagos <i>fabp4</i> -KO não infectados em relação à expressão em macrófagos WT.	45
Figura 6: Análise multivariada por PCA e PLS-DA dos metabólitos referentes aos grupos de macrófagos WT e KO.....	52
Figura 7: Gráficos de VIP score e Volcano Plot dos metabólitos anotados de macrófagos WT e <i>fabp4</i> -KO (KO).	53
Figura 8: Espectrometria de massas e identificação do metabólito 4-ácido aminobutírico (GABA) com respectiva estrutura química.	54
Figura 9: Infecção de macrófagos com <i>L. amazonensis</i>	57
Figura 10: Análise semi quantitativa e qualitativa de Oil Red em infecções por <i>L. amazonensis</i>	58
Figura 11: Expressão de <i>cd36</i> (A), <i>fabp4</i> (B), <i>fabp5</i> (C) e <i>ppar-γ</i> (D) em macrófagos WT e KO infectados ou não com amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	59
Figura 12: Gráficos de expressão de <i>lxr-α</i> (A), <i>abca1</i> (B), <i>inos</i> (C) e <i>il-10</i> (D) em macrófagos WT e KO infectados ou não com amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	63
Figura 13: Gráficos de expressão de <i>jnk</i> (A), <i>ikkβ</i> (B), <i>c-fos</i> (C) e <i>nf-kb</i> (D) em macrófagos WT e KO infectados ou não com amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	65
Figura 14: Gráficos e imagens da abundância proteica de FABP4, CD36, PPAR-γ, LXR-α e ABCA1 em relação a β-actina em amostras de macrófagos WT e KO infectados ou não com <i>L. amazonensis</i>	68
Figura 15: Gráficos e imagens da abundância proteica de JNK, NF-kB, AP-1 e IKKβ em relação a β- actina em amostras de macrófagos WT e KO infectados ou não com <i>L. amazonensis</i>	70
Figura 16: Espectrometria de massas e identificação de metabólitos com diferença estatística significativa entre os grupos WT e WTLa com estrutura química.	72
Figura 17: Espectrometria de massas e identificação de metabólitos com diferença estatística significativa entre os grupos KO e KOLa com estrutura química.....	74
Figura 18: Espectrometria de massas e identificação de metabólitos com diferença estatística significativa entre os grupos KOLa e WTLa com estrutura química.	76
Figura 19: Experimento 1 da infecção <i>in vivo</i>	79

Figura 20: Experimento 2 da infecção <i>in vivo</i>	80
Figura 21: Experimento 3 da infecção <i>in vivo</i>	81
Figura 22: Quantificação de colesterol e triglicérides (TG) a partir de plasma de camundongos WT e fabp4-KO (KO) infectados ou não com <i>L. amazonensis</i>	83
Figura 23: Expressão dos genes em camundongos WT e fabp4-KO após 10 semanas.	85
Figura 24: Expressão dos genes em camundongos WT e <i>fabp4</i> -KO infectados após 10 semanas com <i>L. amazonensis</i>	86
Figura 25: Expressão dos genes em camundongos WT e <i>fabp4</i> -KO infectados após 2 semanas com <i>L. amazonensis</i>	87
Figura 26: Infecção de macrófagos com <i>L. braziliensis</i>	88
Figura 27: Expressão de <i>cd36</i> (A), <i>fabp4</i> (B), <i>fabp5</i> (C) e <i>ppar-γ</i> (D) em macrófagos WT e KO infectados ou não com amastigotas de <i>L. braziliensis</i>	89
Figura 28: Gráficos de expressão de <i>lxr-α</i> (A), <i>abca1</i> (B), <i>inos</i> (C) e <i>il-10</i> (D) em macrófagos WT e KO infectados ou não com amastigotas de <i>L. braziliensis</i>	91
Figura 29: Gráficos de expressão de <i>jnk</i> (A), <i>ikkβ</i> (B), <i>c-fos</i> (C) e <i>nf-kb</i> (D) em macrófagos WT e KO infectados ou não com amastigotas de <i>L. braziliensis</i>	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Tipos de FABPs e tecidos onde estão presentes	23
Quadro 2: Sequências de pares de <i>primers</i> utilizados	35
Quadro 3: Padronização e eficiência dos <i>primers</i> utilizados no presente estudo.....	44
Quadro 4: Metabólitos anotados referentes à comparação entre macrófagos <i>fabp4</i> - KO (KO) e WT nos períodos de 1, 48 e 72h.	54
Quadro 5: Metabólitos anotados referentes à comparação entre macrófagos WT e WTLa nos períodos de 1, 48 e 72h.....	71
Quadro 6: Metabólitos anotados referente a comparação entre macrófagos KO e KOLa nos períodos de 1, 48 e 72h.	73
Quadro 7: Metabólitos anotados referentes à comparação entre macrófagos KOLa e WTLa nos períodos de 1, 48 e 72h.....	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Leishmaniose	16
1.2 Aspectos clínicos	18
1.3 Tratamento.....	19
1.4 A infecção de macrófagos por <i>Leishmania</i>	20
1.5 FABP4 e a infecção de macrófagos por <i>Leishmania</i>	23
1.6 Via de captação de ácidos graxos e efluxo de colesterol.....	26
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Culturas de parasitos e de células hospedeiras.....	31
4.2 Genotipagem.....	32
4.3 Infecções <i>in vitro</i> e coloração com Oil Red O	33
4.4 Análises de transcritos por PCR em tempo real.....	33
4.5 Análise de abundância proteica por <i>Western Blot</i>	36
4.6 Análise metabolômica	37
4.7 Infecções <i>in vivo</i>	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 Genotipagem.....	42
5.2 Expressão gênica e metabólito identificado em macrófagos WT <i>versus fabp4-KO</i>	43
5.3 <i>Leishmania amazonensis</i>	56
5.3.1 Infecção <i>in vitro</i>	56
5.3.1.1 Expressão gênica	58
5.3.1.2 Abundância proteica	66
5.3.1.3 Estudo da metabolômica de infecções intracelulares	70
5.3.2 Infecções <i>in vivo</i>	77
5.3.2.1 Quantificação de colesterol	81
5.3.2.2 Expressão gênica no sítio da lesão murina	83
5.4 <i>Leishmania braziliensis</i>	87
5.4.1 Expressão gênica	88
6 CONCLUSÃO.....	96
Em conclusão, os dados apresentados indicam que:	96
REFERÊNCIAS.....	97

ANEXO A	110
ANEXO B	116
ANEXO C	117
ANEXO D	119
ANEXO E	120

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania* spp. (classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae) e transmitida por fêmeas de insetos flebotomíneos. A classe Kinetoplastea é caracterizada por representantes que possuem cinetoplasto, uma região especializada de mitocôndria única que possui seu próprio DNA, o kDNA. Diversos organismos deste grupo apresentam elevada importância na área da medicina humana e animal, causando impactos sociais e econômicos a populações mais carentes, em sua maioria. Os parasitos do gênero *Leishmania* foram inicialmente notificados em 1885, mas sua descrição foi realizada por Leishman em 1900 e Donovan em 1903 (HANDMAN, 1999; BURZA et al., 2018; ABBEHAUSEN et al., 2024).

São mais de 20 espécies que podem ser transmitidas entre hospedeiros mamíferos por vetores dípteros, no caso, fêmeas de flebotomíneos. Os principais subgêneros presentes na América do Sul são: *Lutzomyia*, *Nyssomyia* e *Bichromomyia* (BRAZIL et al., 2015). Os vetores são hematófagos e caracterizam-se pela presença de muitas cerdas nas asas e tórax, além de serem pequenos, com adultos medindo cerca de 5 mm de comprimento. Os flebotomíneos distribuem-se por regiões tropicais e subtropicais do mundo (OPAS, 2019; CECÍLIO et al., 2022).

A leishmaniose em suas variadas formas clínicas é considerada endêmica em diversos países, representando uma das mais significativas doenças tropicais negligenciadas. Estima-se que ocorram entre 700.000 e 1 milhão de novos casos anualmente no mundo (WHO, 2023; ABBEHAUSEN et al., 2024). No Brasil, a leishmaniose é endêmica e foram reportados mais de 12.000 novos casos de leishmaniose cutânea em 2022, e cerca de 1.600 novos casos de leishmaniose visceral no mesmo período (WHO, 2023). As principais espécies presentes no Brasil são: *Leishmania infantum*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, destas a *L. infantum* é causadora da forma visceral (AKHOUNDI et al., 2016; STEVERDING, 2017).

Ao longo do ciclo dos protozoários causadores da leishmaniose, estes apresentam formas bem definidas: promastigota, fusiforme com flagelo proeminente, e amastigota, forma arredondada com flagelo contido no bolso flagelar e, portanto, não aparente. O ciclo envolve um hospedeiro mamífero e a fêmea de um inseto flebotômíneo. O inseto ingere formas amastigotas durante o repasto sanguíneo no animal vertebrado infectado. No tubo digestivo do flebotômíneo, as formas amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas e aderem ao epitélio intestinal, onde se multiplicam por divisões binárias. Ocorre então um processo de diferenciação denominado metaciclogênese, definido pela transformação da forma divisível para forma móvel indivisível e infectante denominada promastigota metacíclico. Finalmente, novas alterações morfológicas do parasito resultam em sua locomoção do tubo digestivo para o esôfago do inseto onde fica acumulado. Durante o novo repasto sanguíneo, promastigotas infectivos de *Leishmania* spp. são inoculados no hospedeiro vertebrado e infectam células do sistema fagocitário mononuclear, principalmente os macrófagos. Na célula hospedeira, os parasitos permanecem no interior de vacúolos parasitóforos, onde se diferenciam novamente em amastigotas e se dividem até reiniciar o ciclo como demonstrado na **Figura 1** (SACKS e KAMHAWI, 2001; STEVERDING, 2017; BURZA *et al.*, 2018; GARCIA *et al.*, 2025).

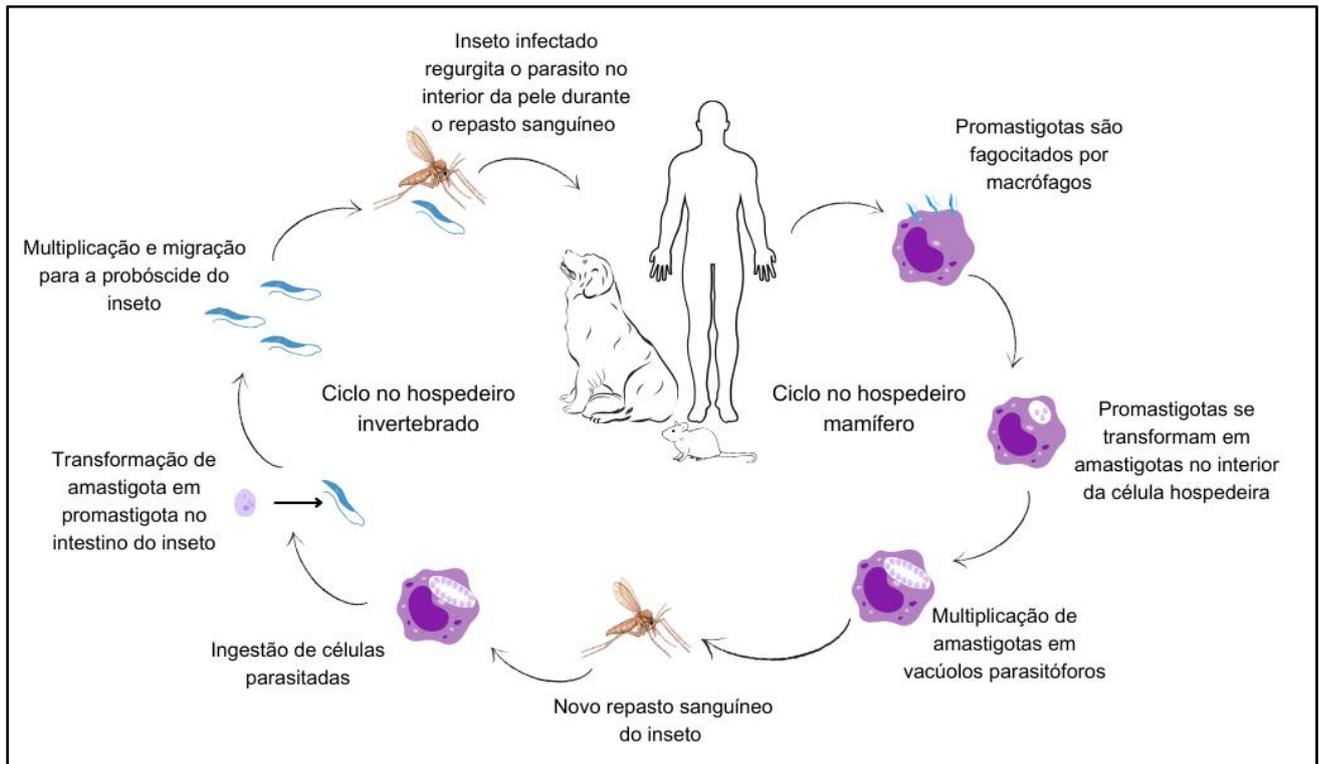


Figura 1: Ciclo representativo de *Leishmania amazonensis*. Os parasitos apresentam duas formas básicas ao longo do ciclo, a forma extracelular promastigota e amastigota. A forma promastigota está presente no inseto vetor e é a forma infectante para os hospedeiros mamíferos. Nestes, formas promastigotas se diferenciam em amastigotas no interior de vacúolos parasitóforos de células do sistema fagocítico, principalmente macrófagos. Fonte: arquivo pessoal.

1.2 Aspectos clínicos

A leishmaniose apresenta diferentes quadros clínicos nos seres humanos, sendo classificadas como leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV). A LC é caracterizada por uma lesão única que assume forma ulcerada com bordas elevadas. As lesões podem gerar cicatrizes desfigurantes que são associadas a estigmas sociais, porém, raramente apresentam risco à vida, visto que possíveis complicações geralmente estão associadas a infecções bacterianas (PINART M et al., 2020). No Brasil, quadros de LC podem evoluir para a LMC, caracterizada por lesões destrutivas nos lábios, septo nasal e palato. É mais frequentemente causada pelas espécies *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (BURZA et al., 2018; PACE, 2014). Já quadros de leishmaniose disseminada podem ser causados pelas espécies supracitadas, além de relatos incluindo também *L. amazonensis*. Esta última espécie pode levar a complicações como a leishmaniose

cutâneo-difusa, com espalhamento de nódulos não ulcerados e hiperparasitados na face, tronco e membros dos indivíduos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A LV, por sua vez, é caracterizada por febre irregular, esplenomegalia e hepatomegalia, tratando-se de uma forma grave que, sem tratamento, pode ser fatal dentro de 2 anos. Na maioria dos casos é causada pela espécie *L. infantum* no Brasil. Já a forma dérmica pós-calazar é uma complicação tardia da LV, raramente observada em pessoas infectadas por *L. infantum* e geralmente associada a quadros de imunossupressão no Brasil, sendo mais relevante no subcontinente indiano, onde é causada por *L. donovani* (BARRAL et al., 1991; PACE, 2014; BURZA et al., 2018).

O fato de se tratar de uma doença com amplo espectro clínico, dificulta também o tratamento dos pacientes acometidos.

1.3 Tratamento

No Brasil, o tratamento é realizado de acordo com as diretrizes do Ministério da Saúde e da Organização Mundial da Saúde. Os medicamentos aprovados são: antimonial pentavalente, anfotericina B, pentamidina e miltefosina (BRASIL, 2020).

Para LC em adultos no Brasil, recomenda-se a aplicação intralesional de antimonial pentavalente como primeira escolha. Já para casos sem resposta ao tratamento e para pacientes pediátricos, recomenda-se o uso de miltefosina (BRASIL, 2020). A ação do antimonial pentavalente consiste na inibição da glicólise e da oxidação de ácidos graxos, mas causa diversos efeitos colaterais, principalmente com o acometimento de funções cardíacas (PACE, 2014; ANDRADE NETO et al., 2018; WHO, 2019), o que traz consigo a necessidade de monitoramento constante do paciente durante o tratamento. Vale ressaltar que o uso contínuo de antimoniais pentavalentes no subcontinente indiano tem sido implicado como um fator preponderante na seleção de linhagens resistentes de *L. donovani* (ALCÂNTARA et al., 2018).

Já a miltefosina atua inibindo a biossíntese de fosfolipídeos e esteróis na membrana celular do parasito, interferindo em vias celulares de sinalização e na permeabilidade da membrana plasmática. Portanto, causa a morte celular em promastigotas e em amastigotas. Sua utilização é recente no Brasil e a vantagem de seu uso está na administração oral. Mesmo assim, pode haver alguns efeitos colaterais como náuseas, vômito e diarreia (BRASIL, 2020). Ressalta-se que o uso

da miltefosina em cães está autorizado no país desde 2016 e, para seres humanos, desde 2018 (BRASIL, 2020). Outros medicamentos também aprovados no Brasil são a anfotericina B e a pentamidina. A ação da anfotericina B consiste em afetar a integridade da membrana plasmática do parasito a partir da ligação ao ergosterol e formação de poros nesta membrana. Como este medicamento pode levar a importantes reações adversas, há a formulação lipossomal que diminui sua toxicidade e seu uso vem sendo cada vez mais difundido por conta da eficácia clínica. Por fim, a pentamidina atua inibindo a biossíntese de poliaminas e causa alteração da função e estrutura da membrana da mitocôndria. Ainda assim, apresenta baixa eficácia além de severos efeitos colaterais como distúrbios cardiotoxicos e metabólicos (PACE, 2014; ALCÂNTARA et al., 2018; ANDRADE NETO et al., 2018; BRASIL, 2020).

Todos os medicamentos citados foram reposicionados, uma estratégia de tratamento interessante visando a economia financeira e o tempo de seu desenvolvimento, mesmo assim, a busca por novos tratamentos é necessária. Vale ressaltar que a leishmaniose apresenta diferentes espécies causadoras de diferentes manifestações clínicas, não sendo uma doença de fácil controle, principalmente no Brasil, por conta da circulação de parasitos em fauna silvestre. Ainda com dificuldades referentes ao controle dos vetores e de reservatórios, uma gama de estudos objetiva novas estratégias na terapêutica que incluem termoterapia, administração de laser de CO₂, crioterapia entre outros, mas são estudos iniciais e que demonstram a necessidade de um maior conhecimento da biologia parasitária e da patogênese da leishmaniose para a busca de novos alvos terapêuticos (ROATt et al., 2020).

1.4 A infecção de macrófagos por *Leishmania*

Parasitos do gênero *Leishmania* são capazes de infectar diferentes células, sejam elas fagocíticas ou não, porém, apresentam tropismo para os monócitos e macrófagos. Ao serem regurgitados pelo inseto flebotomíneo, as formas metacíclicas precisam se proteger do sistema imunológico do hospedeiro mamífero e, para isso, a superfície de promastigotas expressa moléculas únicas de lipofosfoglicano (LPG) e a metaloprotease gp63, garantindo proteção contra

espécies reativas de oxigênio durante a fagocitose (CUNNINGHAM, 2002; SPATH et al., 2003; NADERER et al., 2004; NADERER et al., 2007).

A fagocitose do parasito pelos macrófagos pode ocorrer diretamente no local da lesão ou indiretamente a partir de outros tipos celulares. Um exemplo são os neutrófilos que infiltram rapidamente o local da picada. Estes podem fagocitar o parasito sendo posteriormente fagocitados por macrófagos residentes do tecido em questão. A interação parasita-hospedeiro pode ocorrer de forma distinta resultando em diferentes respostas imunológicas. Se a resposta for do tipo Th1, haverá a produção de citocinas pró-inflamatórias, como interferon-gama (IFN- γ), que resultará em uma ativação clássica dos macrófagos, ou seja, incremento da produção de óxido nítrico e outras espécies reativas de oxigênio (EROS) que resultam na eliminação dos parasitos. Porém se a resposta for do tipo Th2, ocorrerá a produção de interleucinas que aumentarão a atividade da arginase e resultará em ativação alternativa dos macrófagos, contribuindo para a sobrevivência e proliferação dos parasitos (TIBÚRCIO et al., 2019; KAYE e SCOTT, 2011).

Ao penetrarem na célula via rota endocítica, há a aquisição de marcadores lisossomais como LAMP I e II, Rab GTPases, catepsinas e moléculas MHC classe II junto a estes compartimentos, originando os vacúolos fagolisossomais que, neste caso, serão chamados de vacúolos parasitóforos. Nestes vacúolos, os parasitos se transformarão nas formas amastigotas quando expostos a fatores como o aumento de temperatura, diminuição do pH e da disponibilidade de ferro (ANTOINE et al., 1998; MITTRA et al., 2013). Trata-se de uma adaptação da espécie que passa a viver em um ambiente hostil que, supostamente, a eliminaria; tanto que outros diferentes patógenos evitam a rota fagocítica para evitar a resposta microbicida de macrófagos (MCCONVILLE et al., 2007).

Nos vacúolos parasitóforos, as formas amastigotas passam a expressar transportadores de membrana para absorção de diversos metabólitos do fagolisossomo. Uma característica dos amastigotas é expressar diferentes transportadores para um mesmo grupo de metabólitos, assim, possíveis mutações nesses transportadores não impedem a aquisição de nutrientes e a multiplicação do parasito (MCCONVILLE et al., 2007). Além disso, o ambiente vacuolar é dinâmico e possui macromoléculas que são degradadas por hidrolases luminais ou são

absorvidas pelos amastigotas e degradadas pelo seu próprio lisossomo (MCCONVILLE et al., 2015).

A forma amastigota, difere-se ainda no metabolismo de carbono. No inseto vetor, a forma promastigota capta aminoácidos e glicose para produção de energia. Já a forma amastigota reduz a captação de glicose e passa a utilizar também ácidos graxos (MCCONVILLE et al., 2015) como demonstrado na **Figura 2**.

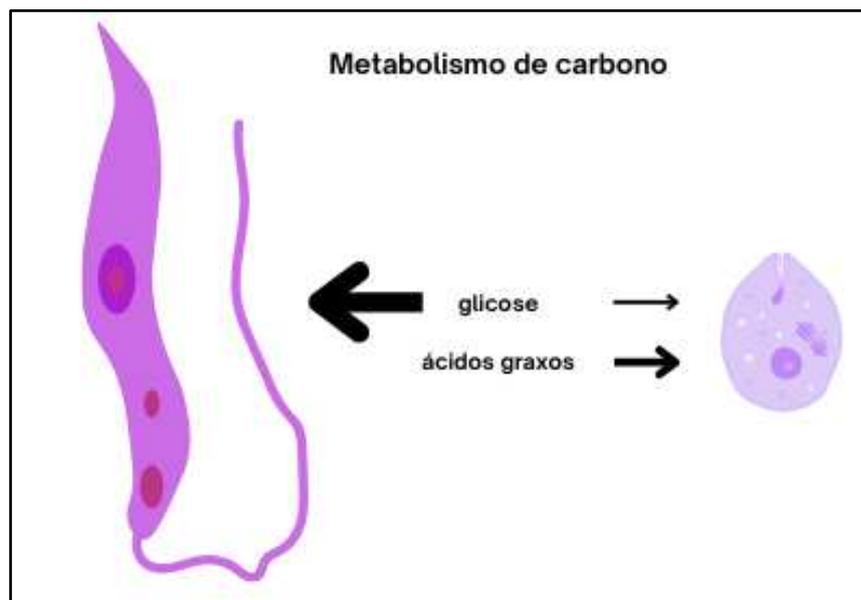


Figura 2: Alteração nas fontes de carbono utilizadas pela forma promastigota (esquerda) e amastigota (direita) de *Leishmania*. Adaptado de (McConville et al., 2015).

Vista a ocorrência desta alteração adaptativa na forma amastigota causadora da doença em mamíferos, é relevante compreender como estes ácidos graxos são captados pelo parasito. Em 2009 e 2012, foram publicados estudos de análise de transcriptoma total de macrófagos infectados com *L. major* e *L. amazonensis*. Os dados indicaram alguns genes com expressão aumentada e um deles que se destacou foi *fabp4* (FORTÉA et al., 2009; RABHI et al., 2012). Além disso, sabe-se que corpos lipídicos são importantes fontes de triacilglicerol e colesterol, podendo contribuir para a síntese de componentes de membrana nestes protozoários (LECOEUR et al., 2013). Como a proteína FABP4 é uma transportadora de ácidos graxos no interior de macrófagos, especula-se que o controle de sua expressão pode ser importante para a sobrevivência do parasito no interior do vacúolo parasitóforo.

1.5 FABP4 e a infecção de macrófagos por *Leishmania*

Os lipídios são moléculas que apresentam diversas funções e, portanto, tornaram-se alvos de pesquisa. Dentre elas, estão o envolvimento como fonte de energia para células, funções estruturais, sinalização intra e extracelular. Em células de mamíferos, o tráfego de lipídios é coordenado por proteínas ligantes de ácidos graxos (FABPs; *Fatty Acid Binding Proteins*). Trata-se de uma família com 9 proteínas descritas, sendo cada uma delas com maior expressão dependendo do tecido (**Quadro 1**). São proteínas citoplasmáticas pequenas (~12 kDa) capazes de interagir com ligantes hidrofóbicos como eicosanóides, ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia longa e outros lipídios. Em adipócitos e macrófagos, em menor grau neste último tipo celular, a FABP tipo 4 (FABP4) é abundante e atua diminuindo a disponibilidade de lipídios e ácidos graxos no citosol (MAEDA et al., 2005; MAKOWSKI et al., 2005; FURUHASHI e HOTAMISLIGIL, 2008).

Quadro 1: Tipos de FABPs e tecidos onde estão presentes. Fonte: adaptado de Furuhashi e Hotamisligil, 2008.

Tipo de FABP	Órgãos/tecidos principais	Demais sítios
FABP1	Fígado	Intestino, pâncreas, rim, pulmão e estômago
FABP2	Intestino	Fígado
FABP3	Coração	Músculo esquelético, cérebro, rim, pulmão, estômago, testículo, glândula adrenal, glândula mamária, placenta, ovário e tecido adiposo marrom
<i>*FABP4</i>	<i>Tecido adiposo</i>	<i>Macrófagos e células dendríticas</i>
FABP5	Epiderme	Língua, adipócito, macrófago, célula dendrítica, glândula mamária, cérebro, intestino, rim, fígado, pulmão, coração, músculo esquelético, testículo, retina e baço
FABP6	Íleo	Ovário, glândula adrenal e estômago
FABP7	Cérebro	Célula glial, retina e glândula mamária
FABP8	Sistema nervoso periférico	Células de Schwann
FABP9	Testículo	Glândula salivar e glândula mamária

O papel da FABP4, portanto, está relacionado ao transporte de ácidos graxos saturados ou insaturados da membrana plasmática para sítios envolvidos no metabolismo e sinalização de lipídios na célula como mitocôndria, retículo endoplasmático, peroxissomo e gotículas lipídicas. Por serem pequenas, podem acessar o núcleo transportando ácidos graxos ligantes de fatores de transcrição (WOLFRUM et al., 2001; MAKOWSKI et al., 2005). Além disso, atuam em diversas vias regulando o metabolismo lipídico, a inflamação, produção de glicose e podem ainda influenciar na patogênese de doenças como aterosclerose e diabetes (HOTAMISLIGIL e BERNLOHR, 2015; BOUTAGY et al., 2024).

Na ausência de FABP4, há o aumento dos ácidos graxos livres que são capazes de inibir a via NF- κ B, resultando no bloqueio da resposta inflamatória e aumento da atividade do PPAR γ (Peroxisome Proliferator- Activated Receptor Gamma), promovendo o tráfego acelerado de colesterol (MAKOWSKI et al., 2005). Tratam-se de vias que influenciam na infecção por espécies de *Leishmania*. Em 2017, Semini et al. mostraram alterações relevantes no tráfego de colesterol em macrófagos infectados por *L. mexicana*, revelando que o sequestro deste esterol é dependente do número de parasitas intracelulares (SEMINI et al., 2017).

A proteína FABP4, em adipócitos, interage com lipase sensível a hormônios para modular sua atividade e com vias de sinalização de respostas inflamatórias, principalmente através da via JNK/IKK, como demonstrado na **Figura 3**. Além disso, a FABP4 também tem atividade importante no controle da produção de hormônios lipídicos em adipócitos (FURUHASHI e HOTAMISLIGIL, 2008; PRENTICE et al., 2019; INOUE et al., 2023). Em macrófagos, a FABP4 influencia a via IKK/NF- κ B, relacionada a respostas inflamatórias, e reduz o efluxo de colesterol por meio da inibição da via PPAR- γ /LXR- α /ABCA1. Além disso, tanto em macrófagos quanto em adipócitos, a FABP4 tem um papel na integração de sinais lipídicos às respostas de organelas, particularmente no retículo endoplasmático (FURUHASHI e HOTAMISLIGIL, 2008; BAŞARIR SIVRI e ÇIFTÇI, 2024) (**Figura 3**).

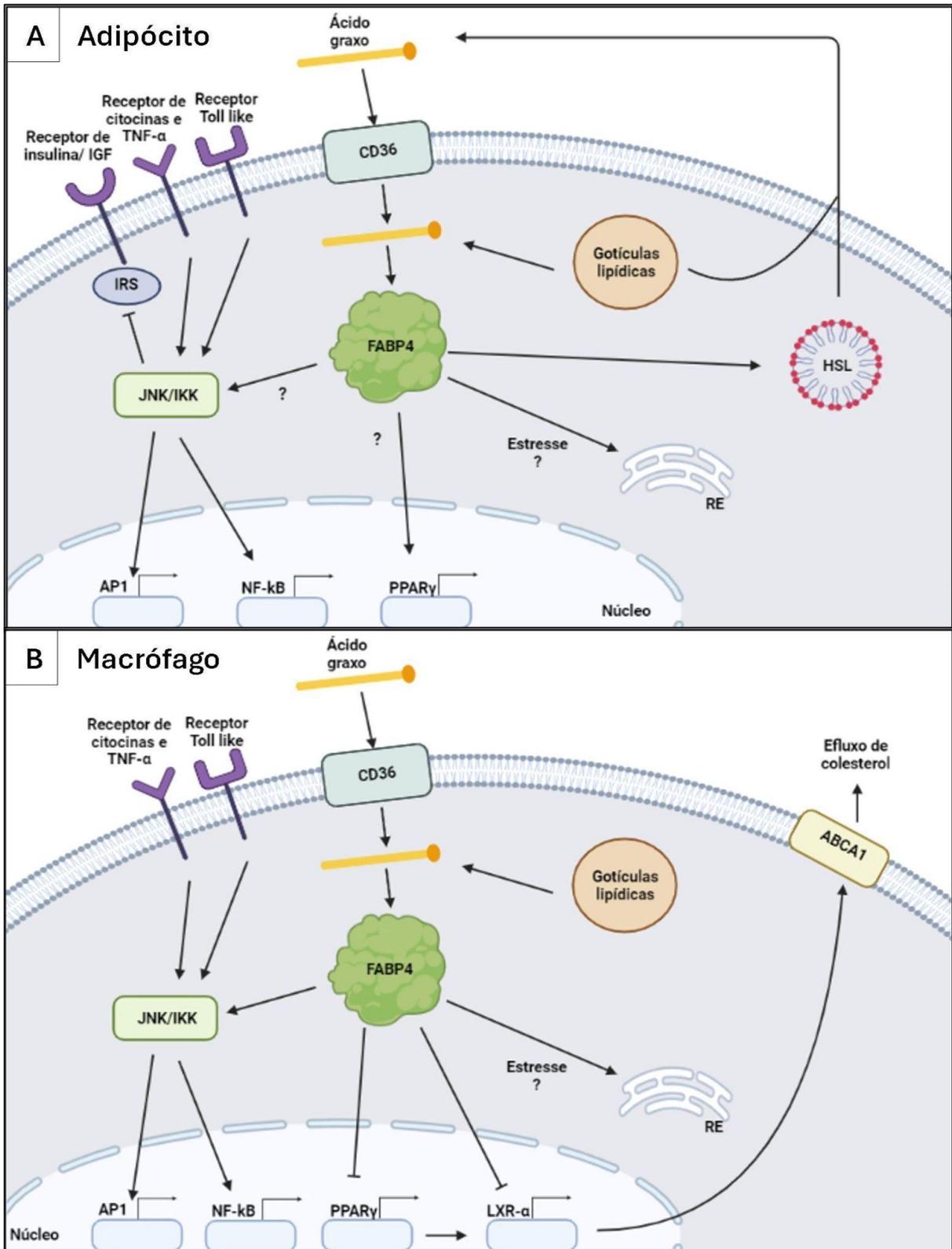


Figura 3: Proteínas moduladas pela FABP4. **A.** Em adipócitos, a FABP4 pode influenciar respostas inflamatórias a partir da via JNK/IKK, além do influxo de ácidos graxos. Pode ainda modular fatores de transcrição e apresenta importante papel na produção de hormônios lipídicos. **B.** Em macrófagos, a FABP4 regula a inflamação pela via IKK/NF-κB e o efluxo de colesterol. Fonte: modificado de FURUHASHI e HOTAMISLIGIL, 2008.

1.6 Via de captação de ácidos graxos e efluxo de colesterol

As proteínas representadas na **Figura 3** são moduladas por FABP4 em algumas circunstâncias, como descrito anteriormente. Porém, além disso, outras funções também podem ser moduladas durante a infecção por *Leishmania*.

A CD36 (cluster de diferenciação 36) é uma glicoproteína transmembrana que atua no transporte de ácidos graxos de cadeia longa além de ser um receptor de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) e DAMPs (padrões moleculares associados a danos). No contexto imunológico, influencia na diferenciação de macrófagos e células T (CHEN et al., 2022; ASHAQ et al., 2024).

As proteínas JNK (c-Jun N-terminal quinase) e IKK (inibidor de fator nuclear kappa quinase) atuam em vias de sinalização celular inter-relacionadas. A JNK é uma quinase ativada por mitógenos e está envolvida em proliferação, diferenciação e apoptose celular. Sua ativação ocorre por espécies reativas de oxigênio (EROs), citocinas (TNF (fator de necrose tumoral), IL-1 (interleucina 1)), patógenos intra e extracelulares e estresse do retículo endoplasmático. Além disso, sua ativação estimula o fator de transcrição AP-1 (proteína ativadora 1) (CHU et al., 1999; SEKI et al., 2012).

Já a proteína IKK é importante para a resposta imune e inflamatória através da via NF- κ B (fator nuclear kappa de células B). É composta por três subunidades: α , β e uma subunidade reguladora γ . Sua ativação permite a translocação do NF- κ B para o núcleo e a ativação de genes alvo (LEONARDI et al., 2000).

NF- κ B e AP-1 são moduladas por IKK e JNK, respectivamente. NF- κ B é uma importante proteína reguladora da resposta inflamatória e sua ativação pode ocorrer de diferentes formas. Pela via clássica, a ativação ocorre a partir de estímulos de produtos bacterianos, citocinas inflamatórias e outros relacionados à ativação imunológica. Esses estímulos facilitam a ativação do complexo IKK, capaz de mediar a degradação do inibidor de κ B (I κ B), que permite a translocação da proteína para o núcleo, modulando a transcrição de genes pró-inflamatórios. Além disso, também possui papel na regulação do crescimento celular e na resposta ao estresse oxidativo (ANILKUMAR e WRIGHT-JIN 2024).

Já a proteína AP-1 é um fator de transcrição formado principalmente por dímeros de subunidades Jun e Fos (SONG et al, 2023). Dentre as funções desempenhadas, está a regulação da proliferação celular, da resposta ao estresse e

influenciar o grau de inflamação. Estudos demonstraram que inibir a via de sinalização NF- κ B e JNK/AP-1 leva à redução da atividade celular anti-inflamatória, mais especificamente a expressão de c-FOS/AP-1 (LI et al., 2024). Além disso, a subunidade c-FOS apresenta expressão aumentada durante o estágio inicial de adipogênese de fibroblastos precursores 3T3-L1 (BOSE et al., 2024).

Outras proteínas presentes na via estão diretamente envolvidas no metabolismo lipídico. Dentre elas estão o PPAR- γ que também é um fator de transcrição. Esta proteína tem papel importante no metabolismo lipídico e regula genes envolvidos na liberação, transporte e armazenamento de ácidos graxos, como LPL (lipoproteína lipase) e CD36 (JANANI e KUMARI, 2015). Além disso, possui estreita relação com FABP4, visto que na ausência desta, há incremento da atividade de PPAR- γ , elevando níveis de ácidos graxos livres capazes de se ligar a esta proteína, influenciando na atividade de LXR α (Liver X receptor alpha) e ABCA1 (ATP-binding cassette transporter 1), diretamente envolvidos no aumento do efluxo de colesterol (MAKOWSKI et al., 2005) (**Figura 3**).

LXR α está intimamente envolvido na regulação do metabolismo lipídico e da resposta inflamatória. Trata-se de um fator de transcrição que é ativado por oxisteróis e que induz genes responsáveis pelo catabolismo e excreção de colesterol como ABCA1, reduzindo seus níveis intracelulares. Além disso, possui efeitos anti-inflamatórios a partir da supressão da ativação de macrófagos (VENKATESWARAN et al., 2000; ZHAO et al., 2020).

Finalmente, ABCA1 é uma proteína transmembranar responsável pelo efluxo de colesterol livre e fosfolipídios para apolipoproteínas como, por exemplo, apoA-I para a posterior formação de partículas HDL (High Density Lipoproteins). Pode ainda suprimir a inflamação em macrófagos através dessa interação com apoA-I, ativando genes que reduzem a produção de citocinas inflamatórias (JACOBO-ALBAVERA et al., 2021; TANG et al., 2009).

De fato, a interação entre lipídios e diversas proteínas em compartimentos intracelulares distintos envolvendo a FABP4 é bastante intrincada. Para se manter a homeostase do colesterol, as células animais transportam colesterol entre diferentes membranas. Após a internalização da lipoproteína de baixa densidade (LDL) por endocitose mediada pelos receptores de LDL (LDLRs), o colesterol derivado da LDL é liberado nos lisossomos. Esse colesterol é então direcionado a dois destinos principais: a membrana do retículo endoplasmático e a membrana plasmática. No

retículo, o colesterol exerce duas funções: inibe a ativação das proteínas de ligação ao elemento regulador de esteróis (SREBPs), suprimindo a transcrição dos genes envolvidos na síntese e captação de colesterol, e é esterificado com ácidos graxos para armazenamento sob a forma de ésteres de colesterol em gotículas lipídicas. Já na membrana plasmática, o colesterol atua principalmente com função estrutural, contribuindo para a integridade e fluidez da membrana (revisado em TRINH et al., 2020; YAN e HORNG, 2020). Em suma, a esterificação deste lipídio e seu armazenamento em gotículas lipídicas estão intimamente ligados à atividade da FABP4, que ainda é relevante para sinalizar fatores de transcrição que culminarão com o efluxo de colesterol pelo transportador ABCA1.

2 JUSTIFICATIVA

Nosso grupo de pesquisa observou que a proteína FABP4 pode interferir na infecção de macrófagos com *L. amazonensis* e ser recrutada para captação de ácidos graxos pelos parasitos. Há um aumento da expressão de *fabp4* e níveis de FABP4 em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57/BL6 e Balb/C infectados com *L. amazonensis* por 72 horas. Diante desses resultados, foi proposta a utilização de inibidor específico de FABP4 e, ao longo da infecção, houve redução da carga parasitária em relação ao grupo controle acompanhada por aumento na quantidade de formas amastigotas extracelulares, frequentemente aderidas na membrana plasmática dos macrófagos.

Além disso, na presença do inibidor, houve redução da área dos vacúolos parasitóforos, mais expressivamente para infecções com *L. amazonensis*. Tais achados podem indicar um desfavorecimento do ambiente fagocítico para a permanência e multiplicação do parasito. Outro indício do recrutamento baseou-se em dados de imunofluorescência indireta, os quais mostraram que a marcação da proteína FABP4 é mais intensa próximo aos vacúolos parasitóforos e às formas amastigotas.

Portanto, torna-se importante avaliar componentes da(s) via(s) modulada(s) por esta proteína tanto para a melhor compreensão da fonte de nutrientes obtidos pelo parasito, como para a identificação de etapas essenciais da sinalização que possam favorecer ou não a sobrevivência de amastigotas intracelulares. Como os resultados iniciais foram obtidos com inibidor específico para FABP4 e este possui ligação reversível, torna-se importante verificar se este padrão se repete em camundongos nocauteados de corpo inteiro para FABP4. A avaliação *in vivo* e *in vitro*, juntamente com análises de outras proteínas reguladas pela FABP4, podem contribuir para ampliação do conhecimento acerca dos mecanismos de sobrevivência do parasito no interior do vacúolo parasitóforo e fornecer dados sobre alvos essenciais para desenvolvimento de novos fármacos.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral desta tese consiste no estudo de como proteínas envolvidas na via associada ao transporte de ácidos graxos por FABP4, desde a entrada dos ácidos graxos até o efluxo de colesterol, estão relacionadas à sobrevivência de *Leishmania*.

Especificamente, foram traçados os seguintes objetivos:

I. Avaliar a expressão gênica de *cd36*, *jnk*, *ikk*, *ap1*, *nf-kb*, *lxr-α*, *abca1*, *ppar-γ*, *fabp4*, *fabp5*, *inos*, *il-4*, *il-10* e *il-12* e a abundância das seguintes proteínas: CD36, JNK, IKK, AP1, NF-Kb, LXR-α, ABCA1, PPAR-γ e FABP4 em macrófagos WT e *fabp4*-KO infectados ou não com *Leishmania*;

II. Determinar o perfil metabolômico por GC-MS de macrófagos WT e *fabp4*-KO infectados ou não com *L. amazonensis*;

III. Realizar infecções na pata de camundongos C57/BL6 WT e *fabp4*-KO com *L. amazonensis* e avaliar o progresso da infecção, além de verificar os níveis de transcritos de genes de interesse no sítio da lesão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Culturas de parasitos e de células hospedeiras

Culturas de promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/2903) foram mantidas em garrafas de cultura de 25 cm² contendo 10 mL de meio 199 (Sigma-Aldrich), suplementado com penicilina 50 unidades/mL, estreptomicina 50 µg/mL, HEPES 40 mM (pH 7.4), adenina 0,1 mM, biotina 0.0001%, hemina 0.0005% e 10% de soro fetal bovino - SFB (Cultilab®). As culturas foram mantidas a 26°C com a realização de repiques semanais para a manutenção dos parasitos em até 4 passagens. No caso de *L. braziliensis*, 5% de urina masculina estéril e 10% de SFB foram acrescentados às culturas.

Para estabelecimento das infecções, as culturas de promastigotas foram diferenciadas em amastigotas. Para *L. amazonensis*, metade do volume da cultura de promastigotas em fase estacionária foi descartado e adicionado o mesmo volume de meio 199, pH 4,8. A cultura foi mantida por 24 horas em estufa a 26°C. Após este período, 1 parte da cultura foi adicionada a 4 partes de meio 199, pH 4,8 e mantida em estufa a 32°C por 7 dias.

Já para *L. braziliensis*, todo o volume de cultura de promastigotas em fase estacionária foi centrifugado a 1500 x g por 5 minutos a 26°C e o *pellet* foi ressuspenso em meio 199, pH 5,4 suplementado com 10% de SFB. A cultura foi mantida em estufa a 34°C por 7 dias.

Para a obtenção de macrófagos primários (projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório - CEUA/UNICAMP #5476 1/2020 e #6293-1/2023), foram extraídas células precursoras de medula óssea de fêmures e tíbias de camundongos C57/BL6 deletados para FABP4 (*fabp4-KO*), além de C57/BL6 selvagem (WT). Os camundongos deletados para *fabp4* foram importados do laboratório do Dr. G. Hotamisligil da School of Public Health – Harvard University e foram mantidos em gaiolas Alesco com sistema de filtração, em ciclo claro/escuro e climatizadas de acordo com as condições já adaptadas do Biotério do Laboratório de Doenças Tropicais do IB-UNICAMP. Os animais receberam ração autoclavada Nuvilab CR1-Nuvital e água filtrada *ad libitum*. As trocas das maravalhas e complementação de ração e água eram feitas duas vezes na semana.

Após a eutanásia dos animais, de acordo com protocolo CEUA, foram retirados fêmur e tibia e as epífises foram cortadas. O conteúdo medular com células precursoras da medula óssea foi lavado com meio R2030 (modificado do meio RPMI completo contendo: 50% de RPMI completo, 20% de SFB, 30% de sobrenadante de fibroblastos L929 e gentamicina 10mg/mL) utilizando-se uma seringa de 5mL e agulha 26G e mantido em placas de 7,5cm de diâmetro contendo 10mL meio R2030. As placas foram mantidas em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% CO₂. Após 4 dias, as placas foram analisadas em microscópio invertido (Leica Biosystems) e foram adicionados 5mL do meio R2030. Ao fim de uma semana, os macrófagos diferenciados foram recolhidos em meio RPMI após soltura com raspador de células estéril (Biofil®), centrifugados a 1000 x g por 5 minutos a 4°C e ressuspensos em meio RPMI para contagem em câmara de Neubauer para serem plaqueados em placas de 6 ou 24 poços.

4.2 Genotipagem

Uma porção da cauda dos animais foi utilizada para extração de DNA genômico. O material foi adicionado em tampão de lise (100mM Tris-HCl, pH 8.7; 5mM EDTA, pH 8.0; 0,2% SDS e 200mM NaCl), proteinase K (20mg/mL) e mantido a 55°C *overnight*. Após este período, foi adicionado álcool isoamil-fenol-clorofórmio, os tubos foram agitados vigorosamente e centrifugados a 6000 g para separação de fases. A fase superior foi coletada e adicionada a novo tubo para adição de etanol 100% e posterior centrifugação. Apenas 1000µL do sobrenadante foi descartado para adição de etanol 70%. Foi realizada uma nova centrifugação a 5000 g seguida do descarte do sobrenadante e adição de água deionizada para reidratação do DNA. As amostras foram então mantidas a 4°C.

Depois foi realizada a amplificação dos seguintes primers: aP2-1 (CAGCACTCACCCACTTCTTTCAT), aP2 402F (ACATACAGGGTCTGGTCATG) e neo-2 (ATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCCT), nas seguintes condições: 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 57.1°C por 20 segundos e 72°C por 50 segundos, finalizando com 1 ciclo de 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados após corrida em gel de agarose 1,5%. Trata-se de um protocolo utilizado como rotina para genotipagem dos animais *fabp4*-KO mantidos pelo grupo

do Dr. G. Hotamisligil (Harvard University). Os possíveis produtos do PCR foram: 255 pb (WT), 800 pb (*fabp4*-KO) e as duas bandas para heterozigotos.

4.3 Infecções *in vitro* e coloração com Oil Red O

Macrófagos diferenciados foram incubados com amastigotas axênicos de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* nas razões de 2 e 5 parasitos por macrófago, respectivamente. Resumidamente, as células foram plaqueadas e, após 1h, os amastigotas foram adicionados para incubação por 1, 24 e 72h a 34°C em meio RPMI contendo 10% de SFB. Porcentagens de infecção e número de amastigotas por célula infectada para cada uma das condições foram quantificados a partir de imagens de culturas fixadas com metanol, coradas com Instant Pro[®]Newprov (Pinhais, PR, Brasil) (MIGUEL et al., 2007) e apresentados como médias \pm erro padrão da média (SEM) dos três experimentos independentes realizados, cada um, em triplicatas. O microscópio com sistema EVOS XL Core (Thermo Scientific Fisher) foi utilizado para obtenção de fotomicrografias. As análises estatísticas foram obtidas a partir do *software* GraphPad Prism[®] (San Diego, CA, USA). Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Triplicatas das infecções e culturas de macrófagos não infectados foram cultivadas em placas de 24 poços e, após os períodos determinados, foram fixadas em paraformaldeído 4% (PFA 4%) por 30min, depois coradas com Oil Red O (Sigma-Aldrich) por 2 h. Após a coloração, os poços foram lavados 1 vez com PBS 1X e incubados em 100 μ L de isopropanol / água bidestilada (v/v) para extração de Oil Red O e posterior transferência do conteúdo para uma placa de 96 poços para quantificação da absorbância no comprimento de onda de 492 nm em espectrofotômetro Hitachi F-2500 (Hitachi Ltd, Japan). Lamínulas também foram utilizadas para cultivo nas mesmas condições para fixação e coloração também nas mesmas condições, porém, após lavagem com PBS 1X, foram coradas também com Giemsa (Renylab) a 10% por 6 min e avaliadas em microscópio ótico (DU et al., 2023).

4.4 Análises de transcritos por PCR em tempo real

Culturas infectadas e não infectadas foram utilizadas para avaliação da expressão dos genes *cd36*, *jnk*, *ikk beta*, *ap1*, *nf-kb*, *lxr- α* , *abca1*, *ppar- γ* e *fabp4* e,

além disso, foram avaliados mediadores imunológicos (*inos*, *ifn- γ* , *il-4*, *il-10* e *il-12*) e o gene *fabp5*, capaz de compensar a redução da expressão de *fabp4*. A expressão de todos os genes alvo foi analisada em relação ao gene de expressão constitutiva *hprt1* (*Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*).

Para isso, foi realizada a extração de RNA das culturas com Trizol® (Invitrogen) de acordo com as normas do fabricante. A partir da extração, foram utilizados 2 μ g de amostra para a síntese de DNA complementar (cDNA). Primeiramente, foi realizado o tratamento das amostras de RNA com DNase (DNA-free™ Kit DNase Treatment & Removal - Thermo Fisher Scientific). Após a remoção de contaminantes de DNA, foi realizada a transcrição utilizando 50 μ M de oligo DT para selecionar RNA mensageiro e, a seguir, utilizado o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) para a reação de transcrição reversa. As fitas de DNA complementar foram então sintetizadas em termociclador nas seguintes condições: 10 minutos a 25°C; 120 minutos a 37°C; 5 minutos a 85°C e 4°C ∞ . As amostras foram armazenadas a -20°C.

As sequências de primers utilizadas foram obtidas a partir de Furuhashi et al., 2007, para *Mus musculus* (*hprt1*, *fabp4*, *fabp5* e *abca1*). Para os demais (*cd36*, *jnk*, *ikk beta*, *ap1*, *nfkb*, *lxr- α* , *ppar- γ* , *inos*, *ifn- γ* , *il-4*, *il-10* e *il-12*), utilizou-se o programa Oligo Analyzer. Os fragmentos foram submetidos ao programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/bast) para confirmar a homologia com o gene de interesse e estão descritos no **Quadro 2**.

Quadro 2: Sequências de pares de *primers* utilizados.

Nome do gene	Sequência <i>foward</i>	Sequência <i>reverse</i>
<i>cd36</i>	5' GGAAGTGTGGGCTCATTGC 3'	5' CATGAGAATGCCTCCAAACAC 3'
<i>jnk</i>	5' GCAGCCGTCTCCTTTAGGT 3'	5' CATTGACAGACGGCGAAGA 3'
<i>ikk beta</i>	5' ATGTGGAGCCTGGGAAATG 3'	5' AGCGGTCTCTGTTCTTTGG 3'
<i>ap1</i>	5' GCAGAAAGTCATGAACCACG 3'	5' GCAACCAGTCAAGTTCTCAAG 3'
<i>nf-kb</i>	5' ACCACTGCTCAGGTCCACTGTC 3'	5' GCTGTCACTATCCCGGAGTTCA 3'
<i>lxr-α</i>	5' GCCTCAATGCCTGATGTTTC 3'	5' CTGCATCTTGAGTTCTGTCTTC 3'
<i>abca1</i>	5' GGACATGCACAAGGTCCTGA 3'	5' CAGAAAATCCTGGAGCTTCAAA 3'
<i>ppar-γ</i>	5' TGAGGAGAAGTCACACTCTG 3'	5' TGGGTCAGCTCTTGTGAATG 3'
<i>fabp4</i>	5' CCGCAGACGACAGGA 3'	5' CTCATGCCCTTTCATAAACT 3'
<i>hprt1</i>	5' TCAGTCAACGGGGGACATAAA 3'	5' GGGGCTGTACTGCTTAACCAG 3'
<i>fabp5</i>	5' GGAGAGCAGGATAACAAGAAAAC 3'	5' AGCATATTCCTCTGGCAGC 3'
<i>inos</i>	5' TGGTGAAGGGACTGAGCTGT 3'	5' CCAACGTTCTCCGTTCTCTTG 3'
<i>il-4</i>	5' CGAATGTACCAGGAGCCATATC 3'	5' TCTCTGTGGTGTCTTTCGTTG 3'
<i>il-10</i>	5' GTCATCGATTTCTCCCCTTG 3'	5' ATGGCCTTGTAGACACCTTG 3'
<i>il-12</i>	5' GGTCCAGCATGTGTCAATCA 3'	5' ATGTCATCTGTGGTCTTCAGC 3'
<i>ifn-γ</i>	5' CACGGCACAGTCATTGAAAG 3'	5' GAGATAATCTGGCTCTGCAGG 3'

As reações foram realizadas em triplicatas utilizando o reagente SYBR Green PCR Master Mix® (Applied Biosystems). A detecção da amplificação em tempo real foi realizada no equipamento QuantStudio 3 Real-Time PCR System – 96 poços (Thermo Fisher Scientific) com a geração de gráficos de fluorescência *versus* número de ciclos.

Foi ainda determinada a melhor concentração dos *primers* para amplificação das amostras. Para isso, foram utilizadas as seguintes combinações entre *primers forward* e *reverse*: 100 nM e 100 nM; 150 nM e 150 nM; 300 nM e 300 nM. Uma vez

determinada a melhor concentração, foi calculada a eficiência alterando-se a concentração da amostra controle. A concentração que apresentou 100% com erro de 5% de eficiência foi escolhida para as análises. Concentrações que apresentaram eficiência abaixo da esperada seguiram para análises com ajustes no método de quantificação.

A análise foi realizada por quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os resultados foram apresentados como médias \pm desvio padrão da média (SEM) de três experimentos independentes realizados, cada um, em triplicatas. As análises estatísticas foram obtidas a partir do software GraphPad Prism® (San Diego, CA, USA), para as quais apenas valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.5 Análise de abundância proteica por *Western Blot*

Replicatas da infecção foram utilizadas também para quantificação das proteínas avaliadas: anti- β -actina (NB600-503 - Novus Biologicals®); anti-FABP4 (SC-271529 - Santa Cruz Biotechnology®); anti-PPAR- γ (NEP2-22106 - Novus Biologicals®); anti-AP1 (A5968 - Sigma-Aldrich®); anti-ABCA1 (NB400-105 - Novus Biologicals®); anti-CD36 (NB400-145 - Novus Biologicals®); anti-NF- κ B (N8523 - Sigma-Aldrich®); anti-IKK (SAB4301430 - Sigma-Aldrich®); anti-JNK (J4750 - Sigma-Aldrich®) e anti-LXR- α (NBP1-77106 - Novus Biologicals®). Para isso, foi realizada a extração de proteínas utilizando tampão de extração (Tris-HCl (pH 7.4) 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, SDS 0,1%, Nonidet- P40 1%, desoxicolato de sódio 0,5%, 10 mM ortovanadato (Na_3VO_4), 30 mM fluoreto de sódio (NaF), 40 mM β -Glicerol fosfato ($\text{C}_3\text{H}_9\text{O}_6\text{P}$), PMSF 1 mM e 2% de coquetel de inibidor de protease (AMRESCO)). Todo o conteúdo de células lisadas foi homogeneizado em banho ultrassônico Unique USC 4800 a 40 kHz, a 154W de potência por 10 minutos a 30°C em banho maria duas vezes intercaladas com agitação por 10 segundos e posteriormente centrifugadas a 3000 x g por 20 min a 4°C para realizar a retirada do sobrenadante a fim de quantificar as proteínas em Nanodrop (Thermo Scientific).

As amostras foram homogeneizadas em tampão de amostra (Tris-HCl (pH 6.8) 50mM, 12,5% de glicerol, 1% de SDS, 0,01% de azul de bromofenol e 5% de β -mercaptoetanol), sendo 4 μ L de tampão a cada 10 μ L de amostra. Amostras de 100 μ g de proteína foram aplicadas por canaleta, em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 8-

12% para eletroforese a 120V. A seguir, foi realizado o processo de transferência a 120V por 120 minutos em membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi mantida em solução de bloqueio (5% de BSA (Sigma-Aldrich) em PBS-T 1X (PBS 1X + 0,1% de Tween 20)) por 2 horas à temperatura ambiente e posteriormente incubada a 4°C *overnight* com os anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio, porém, com BSA a 2%. Após este período, as membranas foram lavadas três vezes com PBS-T 1X por 5 minutos cada e incubadas com anticorpo secundário-HRP (Novus Biologicals) por 90 minutos à temperatura ambiente também diluídos na solução de bloqueio, porém com 2% de BSA. Novamente, as membranas foram lavadas 3 vezes com PBS-T 1X por 5 minutos cada para, a seguir, aplicar-se a solução ECL Western Blotting Substrate kit (ABCAM) para visualização das bandas por quimioluminescência em leitor MicroChemi 4.2 (Uniscience).

Após a visualização, foram retestadas as membranas (*stripping*) para incubação dos outros anticorpos. Para isso, foi utilizada solução com 1,5% de glicina, 0,1% de SDS e 1% de Tween 20. A solução foi aquecida por 15 segundos em microondas e adicionada sobre a membrana em agitação por 5 minutos. Após, a solução foi substituída por uma nova à temperatura ambiente por 10 minutos para duas posteriores lavagens com PBS 1X por 10 minutos cada e seguidas de duas lavagens com PBS-T 1X por 5 minutos cada. A seguir, foi realizado o bloqueio da membrana e incubação com anticorpos primários e secundários conforme descrição anterior.

As análises por densitometria das bandas foram realizadas utilizando-se o *software* Image J (NIH-USA) para determinar os níveis de aumento/redução dos níveis de cada proteína em relação aos níveis constitutivos de beta-actina.

4.6 Análise metabolômica

Replicatas das infecções foram separadas para análise de perfil metabolômico por GC-MS. Para isso, as amostras foram submetidas à extração de metabólitos intracelulares desprezando-se o sobrenadante das infecções, lavadas cinco vezes com PBS 1X estéril a 34°C. Após a lavagem, foram adicionados 300 µL de metanol P.A. (Synth) em cada poço com posterior realização do *quenching* metabólico (interrupção imediata da atividade enzimática) a partir do congelamento

do material em nitrogênio líquido e descongelamento em gelo três vezes. A seguir, os tubos foram centrifugados a 2000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante (metabólitos intracelulares) foi recuperado e armazenado a -80°C.

Para a análise, as amostras foram descongeladas em gelo e uma alíquota de cada grupo foi misturada em novo tubo e utilizado para controle de qualidade (QC) e, além disso, em outro tubo foi adicionado apenas metanol puro ('branco'). As amostras foram então centrifugadas a 15400 x g por 15 minutos a 4°C para receberem ácido mirístico (25ppm) em metanol na proporção 3:1 para monitoramento do processo e derivatização. O conteúdo foi centrifugado em concentrador de amostra (Concentrator plus/Vacofuge® plus Eppendorf) a 30°C por 1 hora.

Em seguida, realizou-se o processo de derivatização. Primeiramente, as alíquotas foram submetidas à metoximação a partir da adição de 10µL de cloridrato de metoxiamina (15 mg/mL em piridina), seguido de agitação por 5 minutos. Em seguida, foi realizado o banho de ultrassom 3 vezes, durante 2 min, e entre cada banho as amostras foram agitadas por 2 min. As amostras então permaneceram no escuro à temperatura ambiente por 16 horas.

Após o processo de metoximação, iniciou-se a siliilação, que consistiu na adição de 10 µL de N,O-bistrifluoroacetamida (BSTFA) (1% de TMCS) nos tubos com as amostras e estas foram agitadas por 5 minutos e levadas à estufa por 1 h a 70°C, para completar a reação. Depois de retiradas da estufa, as amostras permaneceram 30 minutos à temperatura ambiente para resfriamento. Em seguida, foram adicionados 100µL de n-heptano contendo 20 ppm de tricosano em cada amostra (padrão interno para monitoramento das análises) e os tubos foram agitados por 2 minutos.

No final dessa etapa, as análises foram realizadas no GC-MS, e os parâmetros instrumentais seguidos foram os indicados pela biblioteca Fiehn (FIEHN, 2016). O equipamento utilizado foi um Cromatógrafo à Gás da Agilent Technologies modelo 7890A acoplado ao Espectrômetro de Massas modelo 5975C do tipo quadrupolo e utilizou-se uma coluna DB-5MS (Agilent Technologies), com 30m de comprimento, 0,250mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura do filme de fase estacionária. O volume injetado por amostra foi de 2µL no modo split na proporção 10:1. Utilizou-se hélio como gás de arraste na vazão de 1,0004mL/min e pressão de

8,2362psi. O gradiente de temperatura foi de 60-280 °C por 37,5 minutos, a faixa de varredura de m/z foi de 50 a 600 Da e a energia de ionização foi de 70 eV.

Os dados brutos obtidos por GC-MS foram inicialmente analisados em duas etapas: pré-processamento e pré-tratamento. A primeira etapa consistiu na remoção do ruído, no alinhamento e na deconvolução dos picos do cromatograma. A segunda etapa foi reservada para a normalização, escalonamento, correção da linha de base e aplicação de outros métodos necessários para tornar o conjunto de dados comparáveis e adequados para a aplicação de técnicas de análise uni e multivariada. Para a realização do pré-processamento e do pré-tratamento, foi utilizado o software MS-Dial, com o auxílio do Excel.

Após essas etapas, uma matriz de dados foi obtida. Essa matriz era composta pelos dados das amostras dispostas em linhas e dos *molecular features* dispostos em colunas. Com a matriz de dados estruturada, a análise quimiométrica foi realizada na plataforma MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>), onde os dados foram explorados por técnicas não supervisionadas, como PCA (Principal Component Analysis) e técnicas de análise supervisionada, como PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis).

A anotação dos potenciais metabólitos foi realizada comparando o espectro de massas obtido com os dados de bibliotecas de espectros de massas disponíveis no laboratório. Além disso, o índice de retenção foi determinado e bases de dados online, como HMDB e MassBank, foram utilizadas para reforçar a anotação dos potenciais metabólitos discriminantes no estudo. Todas essas etapas foram conduzidas em colaboração com o grupo da Dra. Ana Valéria Colnaghi Simionato (LabiTiselius, IQ - UNICAMP).

4.7 Infecções *in vivo*

A genotipagem dos animais WT e *fabp4*-KO foi confirmada por PCR convencional. O DNA genômico foi extraído de uma pequena porção da cauda dos camundongos e a amplificação se deu com os primers aP2-1 (CAGCACTCACCCACTTCTTTCAT), aP2 402F (ACATACAGGGTCTGGTCATG) e neo-2 (ATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCCT), nas seguintes condições: 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 62°C por 20 segundos e 72°C por 50 segundos, finalizando com 1 ciclo de 72°C por 5 minutos. As amplificações foram

visualizadas após corrida em gel de agarose 1,5% a 100V por 90 minutos. Trata-se de um protocolo utilizado como rotina para genotipagem dos animais *fabp4*-KO mantidos pelo grupo do Dr. G. Hotamisligil (Harvard University).

Os camundongos C57/BL6 selvagens e nocautes foram inoculados com 1×10^6 amastigotas axênicos de *L. amazonensis* no coxim plantar traseiro esquerdo para avaliar a progressão da infecção. Foram realizadas medidas das patas semanalmente com paquímetro digital (Mitutoyo) para comparação do crescimento em relação à pata não infectada (obtendo-se a medida do tamanho da lesão em milímetros a partir da diferença de cada uma das patas).

Além disso, aspectos macroscópicos das lesões foram registrados para as patas de cada animal. Dado o período de desenvolvimento de lesão (cerca de 9 semanas) que não compromete a saúde e bem-estar dos animais, os mesmos foram eutanasiados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório - CEUA/UNICAMP (#5476-1/2020 e #6293-1/2023). Vale ressaltar que o projeto foi aprovado junto ao CiBio/Instituto de Biologia-UNICAMP para utilização dos animais transgênicos (2019/06).

Primeiramente, foi coletado sangue da região axial para quantificação de colesterol e triglicerídeos, segundo especificações do kit Bioclin Química Básica Ltda. Cat No. #K083 e #K117 (MG, Brasil). Os reagentes correspondentes foram adicionados à amostra de soro na proporção 1:1, a seguir, as amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho-maria à 37°C por 10 minutos para posterior leitura da absorbância em 500 nm em espectrofotômetro. Para verificar a carga parasitária, os tecidos das patas foram recuperados com uso de lâmina de bisturi estéril, pesados e macerados em homogeneizador de vidro contendo PBS 1x estéril. As amostras resultantes de cada macerado foram centrifugadas a 400 x g por 10 min, 4°C e recuperou-se o sobrenadante. Este foi centrifugado a 2000 x g por 8 min, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e os sedimentos foram lavados três vezes com PBS 1x. O primeiro sedimento obtido foi utilizado para extração de RNA. Ao final das lavagens, meio 199 foi adicionado para diluições seriadas limitantes em placas de 96 poços, a partir das quais foi possível estimar a carga parasitária normalizando-se o número de parasitos por mg de tecido, com exame microscópico das placas no sétimo dia de manutenção a 26°C, segundo MINORI et al., 2025.

Além disso, foram retirados linfonodos caudais, baço e fígado para extração de RNA e posterior análise por PCR em tempo real. Lâminas de *imprint* foram

obtidas de cada material, anteriormente ao isolamento dos parasitos de cada macerado, para fixação em metanol 100% puro e coloração com o kit Instant Prov®Newprov para observação em microscópio óptico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Genotipagem

Em março de 2020, recebemos os camundongos da linhagem C57/BL6 deletados para FABP4 (KO) do laboratório do Dr. Gökhan Hotamisligil da School of Public Health – Harvard University. Os animais foram mantidos em biotério (CEUA/UNICAMP #5476 1/2020 e #6293-1/2023). Foram realizadas PCRs convencionais a partir do DNA genômico para identificação genética dos camundongos e os resultados foram analisados de acordo com o perfil das ampliações, sendo que, a presença de produto amplificado de 800 pb referiu-se aos animais *fabp4*-KO; 250 pb aos camundongos WT e duas bandas com 800 e 250 pb aos animais heterozigotos (HET) (**Figura 4**).

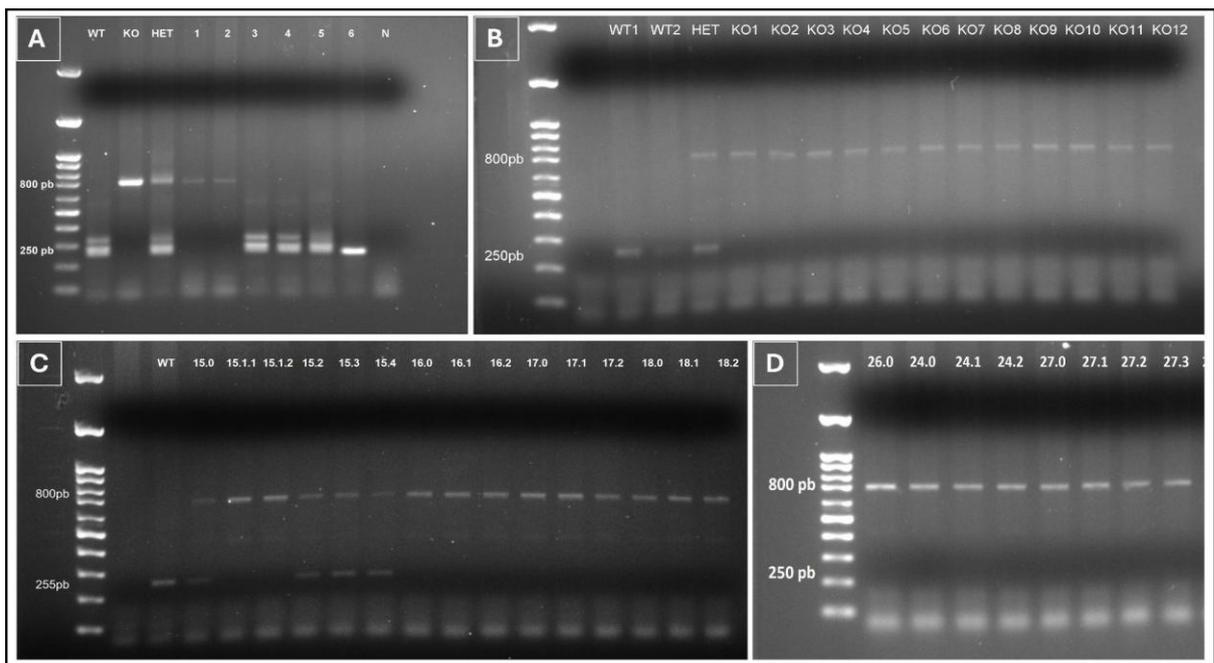


Figura 4: Genotipagem de camundongos C57/BL6. São apresentados quatro géis de agarose a 1,5% com o produto da amplificação do DNA extraído da cauda de cada camundongo. **A.** Imagem de gel de padronização com três amostras conhecidas (WT, KO e HET) e demais amostras para comparação e identificação. 1 e 2 são KO e 3 a 6 são WT. **B.** Imagem de gel com produto amplificado de amostras conhecidas. **C.** Imagem de gel com produto amplificado de uma amostra conhecida (WT) e demais para identificação. 15.0, 15.2, 15.3 e 15.4 são heterozigotos e 15.1.1, 15.1.2, 16.0 a 18.2 são nocauteados para *fabp4*. **D.** Imagem de gel com produto amplificado de amostras para identificação. 26.0 a 27.3 são *fabp4*-KO.

WT: camundongo C57/BL6 selvagem; KO: camundongo C57/BL6 nocauteado para *fabp4*; HET: camundongo C57/BL6 heterozigoto e N: controle negativo. Os números apresentados referem-se às amostras de cada camundongo individual.

5.2 Expressão gênica e metabólito identificado em macrófagos WT *versus fabp4-KO*

Durante o trabalho do mestrado, foram utilizados macrófagos derivados de medula óssea de camundongos Balb/C para avaliação da evolução da infecção *in vitro* com *L. amazonensis* na ausência de FABP4. Os dados mostraram a diminuição na taxa de infecção de macrófagos tratados com inibidor da proteína FABP4 (BMS309403) (COSTA, 2020). Porém, dados da literatura apontam para uma atividade reversível deste inibidor e, por esta razão, foram utilizados camundongos nocauteados de corpo inteiro para o gene *fabp4* na presente tese.

Com o recebimento dos animais, previamente à realização das infecções com *Leishmania* spp, foi importante caracterizar a expressão dos genes de interesse em macrófagos derivados de medula óssea não infectados. Para isso, dois animais, um KO e outro WT, foram separados. Após obtermos a medula óssea de fêmur e tíbia dos mesmos, cultivamos as células com fator de diferenciação para macrófagos presente no sobrenadante de culturas de fibroblastos L929. Após sete dias, estes macrófagos foram contados, plaqueados e mantidos em estufa a 37°C. Após este período, foi extraído RNA total das culturas primárias com Tryzol após 1, 48 e 72h com posterior síntese de cDNA.

Inicialmente, foi realizada a padronização e eficiência dos *primers* com macrófagos WT não infectados para controle. Foram testadas três concentrações de *primers*: 100nM de *forward* e 100nM de *reverse*, 150nM e 150nM, 300nM e 300nM. Após a escolha da melhor concentração, foi determinada a eficiência dos *primers* com diferentes concentrações da amostra de macrófagos WT (**Quadro 3**).

Quadro 3: Padronização e eficiência dos *primers* utilizados no presente estudo.

ID <i>primer</i>	Concentração <i>forward/reverse</i> (nM)	Tm (°C)	Eficiência (%)
<i>hprt1</i>	100/100	79	103
<i>fabp4</i>	150/150	80	97,8
<i>fabp5</i>	100/100	81	92,1
<i>cd36</i>	100/100	79	102,5
<i>jnk</i>	300/300	82	62
<i>ikkβ</i>	100/100	83	102
<i>c-fos</i>	100/100	80	101,4
<i>nf-kb</i>	100/100	80	102
<i>ppar-γ</i>	150/150	82	85,2
<i>lxr-α</i>	100/100	76	102,3
<i>abca1</i>	100/100	77	103,3
<i>inos</i>	300/300	79	176,7
<i>il-4</i>	150/150	84	95,7
<i>il-10</i>	150/150	80	36
<i>il-12</i>	150/150	86	39,7
<i>ifn-γ</i>	150/150	80	52

Uma vez estabelecida tal padronização, as amostras foram analisadas por PCR em tempo real. Como gene endógeno, foi utilizado *hprt1* para avaliação dos níveis de expressão dos genes investigados em macrófagos *fabp4*-KO, em relação à expressão em WT (linha horizontal pontilhada apresentada na **Figura 5**) não infectados e mantidos em meio de cultura por 1, 48 e 72h, períodos de infecção utilizados nos ensaios subsequentes. Ressalta-se que gene *hprt1* codifica a enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, importante no metabolismo de purinas que atua durante a reciclagem de nucleotídeos para a síntese de DNA e RNA (GUO et al., 2022). Por se tratar de um gene importante para funções celulares básicas, é considerado um gene de manutenção e por isso, foi utilizado como gene endógeno em nossos ensaios.

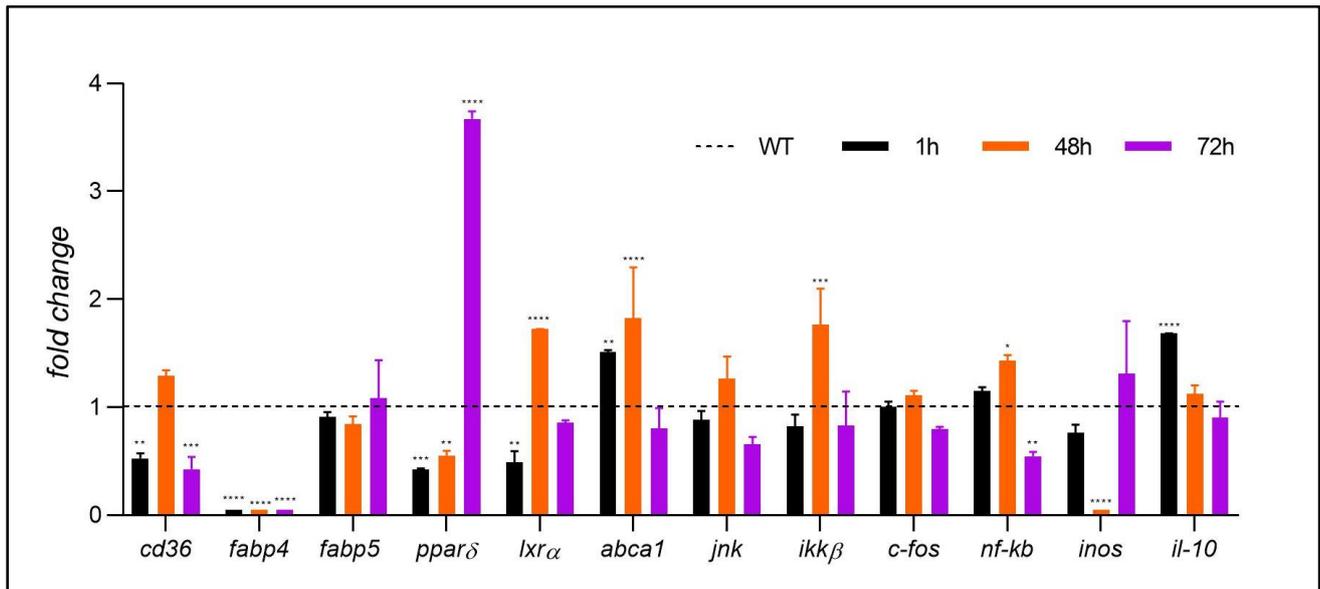


Figura 5: Níveis de transcritos dos genes investigados em macrófagos *fabp4*-KO não infectados em relação à expressão em macrófagos WT. Macrófagos cultivados após 1, 48 e 72h, derivados de camundongos WT e *fabp4*-KO, foram utilizados para extração de RNA e síntese de cDNA. Foi analisada a expressão de *cd36*, *fabp4*, *fabp5*, *ppar-γ*, *lxr-α*, *abca1*, *jnk*, *ikkb*, *c-fos*, *nf-kb*, *inos* e *il-10* em relação ao gene endógeno *hprt1*. A linha pontilhada representa a expressão para macrófagos WT. As barras representam a expressão de macrófagos KO, sendo de cor preta referente à 1h, laranja após 48h e roxa, 72h, relativa à expressão de cada gene para macrófagos WT no seu respectivo tempo. Os resultados correspondem à média \pm DP de triplicata biológicas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ e **** $p < 0,0001$ (teste Two-way ANOVA, Dunnett's multiple). Nas comparações para as quais não há asteriscos, a diferença não foi significativa.

Alguns genes, além daqueles diretamente ativados ou reprimidos pela FABP4, foram incluídos em nossas análises pelas seguintes razões: i. *fabp5*: já foi demonstrado na literatura que, na ausência de FABP4, observa-se o aumento de FABP5, sugerindo um caráter compensatório para o carreamento intracelular de ácidos graxos (HOTAMISLIGIL e BERNLOHR, 2015; HE et al., 2019). De fato, tal efeito biológico deve ser levado em consideração nas análises fenotípicas para modelos de deleção de *fabp4*, ademais quando se trata de tipos celulares capazes de expressar mais de um tipo de FABP (LAN et al., 2011; BANDO et al., 2021); ii. *inos*; *il-4*, *il-10*; *il-12* e *ifn-γ*: proteínas relevantes no controle da resposta imune. Neste caso, o metabolismo de ácidos graxos, incluindo captação e oxidação, pode influenciar a polarização de macrófagos, afetando sua capacidade de promover ou resolver a inflamação. Ressalta-se que por serem células cultivadas *in vitro*, não foram observados sinais de amplificação de *il-4*, *il-12* e *ifn-γ*.

As alterações relacionadas à porção da via responsável pela aquisição de ácidos graxos culminando no efluxo de colesterol foram estudadas primeiramente na

ausência de FABP4. Há tendência ao incremento na expressão de *cd36* em 48h, ainda que não estatisticamente significativo, sugerindo aumento na captação de ácidos graxos por macrófagos na ausência de FABP4. Para 1 e 72h de cultura, a expressão é reduzida em relação aos macrófagos WT, quando comparada aos seus respectivos tempos de cultivo.

No momento inicial (1h), a disponibilidade de ácidos graxos e outros lipídios é limitada apenas ao conteúdo presente no SFB a 10% adicionado ao meio RPMI (Sigma-Aldrich) utilizado nas incubações. Trata-se de um meio rico em glicose, sais inorgânicos e aminoácidos (https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/media-formulations-rpmi-1640?srsId=AfmBOoqv-5e_mUE0WuQG4ofvHWmsmE1CbA4AuQiQhNB-3R8KgMkKMEs), porém, fontes lipídicas não compõem sua formulação. O SFB, por sua vez, contém muitas centenas de componentes, incluindo: proteínas, lipídios, hormônios, eletrólitos, enzimas e fatores de crescimento. Logo, é razoável supor que para este momento, as células adquirem ácidos graxos por meio de outras vias, incluindo: captação de ácidos graxos ligados à albumina pela FATP1 (Fatty Acid Transport Protein 1), sendo a albumina altamente abundante no SFB; liberação de ácidos graxos de lipoproteínas pela LPL (lipoproteína lipase); captação de lipoproteínas por receptores como o CD36 e fagocitose de células apoptóticas (VOGEL et al., 2022; FLORANCE e RAMASUBBU, 2023). No caso de macrófagos WT, parece haver um papel relevante de CD36. Na ausência de FABP4, a célula está adaptada ao menor carregamento de ácidos graxos existente em macrófagos WT, porém, em 48h, *cd36* apresenta aumento de sua expressão em *fabp4*-KO, fato que pode ser explicado por possíveis níveis compensatórios da FABP5 (HOTAMISLIGIL e BERNLOHR, 2015; HE et al., 2019), que mostram-se com expressão próxima àquelas de macrófagos WT nos três tempos investigados (**Figura 5**). Por se tratar de uma fonte de animais deletados para corpo inteiro (*fabp4*-KO *whole body*), os níveis de FABP5 podem estar ajustados para adaptação e sobrevivência da linhagem estabelecida. Possivelmente, com o acúmulo de ácidos graxos intracelulares, sugere-se que a expressão de *cd36* possa retornar aos níveis anteriores no tempo mais tardio (72h; **Figura 5**), sendo este um período em que podem existir debris e células descoladas da monocamada, sendo ocasionalmente fagocitadas e servindo como fontes de nutrientes lipídicos, via de captação independente de CD36.

No caso do receptor nuclear PPAR- γ , que atua como fator de transcrição dependente de ligantes, sabe-se que este desempenha papel crucial na regulação do metabolismo lipídico e sensibilidade à insulina, com associação inversamente proporcional aos níveis de FABP4 em adipócitos (MAKOWSKI et al., 2005; FURUHASHI e HOTAMISLIGIL, 2008; **Figura 3B**). Porém, em macrófagos, a FABP4 pode ativar PPAR- γ em algumas circunstâncias como no início da diferenciação de macrófagos, mesmo assim, no macrófago maduro, ambos possuem funções interligadas durante sua polarização. Quando ocorre a polarização para M2, há um aumento de citocinas IL-4 e IL-10 que são anti-inflamatórias, neste processo a FABP4 inibe a via TLR4/NF- κ B através da ativação de PPAR- γ que, por sua vez, reduz a secreção de fatores inflamatórios e aumenta a expressão de *fabp4*, gerando um ciclo (GARIN-SHKOLNIK et al., 2014; BOß et al., 2015; BERVEJILLO et al., 2020).

Na **Figura 5**, observam-se níveis detectáveis de *ppar- γ* na ausência de *fabp4*, ainda que baixos em relação aos respectivos controles WT, porém, há aumento significativo de transcritos de *ppar- γ* em 72h. Tal resultado corrobora a regulação dos níveis deste receptor dependente da FABP4. Há evidências indicando que PPAR- γ é responsável por regular, ou ao menos favorecer, o estado imunologicamente tolerante dos macrófagos. Uma das funções dos macrófagos em estado imunotolerante é a reparação tecidual após infecção, a qual envolve a remoção de debris celulares (CUI et al., 2020). Estudos demonstraram que agonistas do PPAR γ promovem o aumento da fagocitose opsonizada mediada pelo receptor Fc γ em macrófagos alveolares de camundongos, sugerindo um possível mecanismo pelo qual o PPAR- γ participa do processo de depuração celular (ARONOFF et al., 2007; REDDY, 2008).

Outro receptor nuclear investigado, capaz de interagir diretamente com FABP4 é o LXR- α (**Figura 3B**). FABP4 pode inibir direta ou indiretamente a atividade do LXR- α , potencialmente ao interferir na capacidade de LXR- α se ligar aos seus genes-alvo. Em macrófagos, a inibição do FABP4 leva ao aumento da expressão de LXR- α e ao aumento do efluxo de colesterol, além de redução da inflamação (NOELIA et al., 2011). A FABP4 também pode suprimir indiretamente a atividade do LXR- α ao induzir estresse do retículo endoplasmático ou por meio de outros mecanismos que afetam a sinalização do LXR- α , embora ainda não se conheçam todas as características desta interação (MAKOWSKI et al., 2005). Nossos achados

mostram que os transcritos deste receptor são mais abundantes na ausência de FABP4, aumentando de 1 para 48h, após alcançar níveis próximos àqueles de macrófagos WT para 72h (**Figura 5**). Uma das hipóteses para explicar esta oscilação pode estar relacionada à fina regulação do eixo PPAR- γ / LXR- α / ABCA1 (LI et al, 2004), conforme demonstrado em macrófagos obtidos de camundongos LDLR $-/-$, para os quais a ativação do PPAR- γ por ligantes leva à indução primária do LXR- α e à indução associada de ABCA1 (CHAWLA et al., 2001). De fato, essa interação pode formar um circuito regulatório que favorece o efluxo de colesterol e a redução da inflamação. Os efeitos específicos do LXR- α e do PPAR- γ podem variar dependendo do contexto e dos ligantes específicos que os ativam (CHAWLA et al., 2001; RIGAMONTI et al., 2008)

Em suma, LXR- α e PPAR- γ interagem para regular o efluxo de colesterol e as respostas inflamatórias em macrófagos. O primeiro fator, ativado por oxisteróis, induz a expressão do ABCA1 e de outros genes envolvidos no efluxo de colesterol, enquanto o segundo, também ativado por LDL oxidada, pode induzir LXR- α e promover a remoção do colesterol. Ambos os receptores também desempenham papéis na supressão da inflamação (CHAWLA et al., 2001). Neste sentido, o transportador envolvido no efluxo de colesterol, ABCA1, teve sua expressão avaliada e, na ausência de FABP4, há aumento significativo detectado em 1 e 48h de cultivo dos macrófagos e níveis muito semelhantes para 72h em relação ao grupo WT (**Figura 5**). Este é de fato um resultado esperado, uma vez que na ausência de FABP4 (*fabp4-KO*), espera-se um fluxo de ativação do eixo PPAR- γ / LXR- α / ABCA1.

Além dos transcritos analisados que estão diretamente envolvidos com proteínas de tráfego lipídico macrófágico, outros genes com papel relevante na polarização M1/M2 foram objetos de análise, conforme descrito a seguir.

A expressão de *jnk* não altera ao longo do tempo assim como de *c-fos*. Trata-se de genes que codificam proteínas importantes na ativação e polarização de macrófagos. Além disso, JNK pode contribuir para a proteção destas células em quadros de aterosclerose. Em relação ao c-FOS, estudos indicam que esta proteína inibe a expressão de iNOS (BABAIEV et al., 2016; GUO et al., 2019; OKADA et al., 2000). Como não há estímulo de patógenos nestas células, apenas uma inflamação natural decorrente de possível acúmulo de colesterol na ausência de FABP4, não são observadas modulações para os genes em questão (**Figura 5**).

Já os níveis de transcritos de *ikkβ* e *nf-kb* mostram-se aumentados em 48h em macrófagos *fabp4*-KO. É bem estabelecido na literatura que a proteína IKK β ativa NF- κ B, promovendo inflamação (LAWRENCE et al., 2005; LI et al., 2005). Porém, para 72h de cultivo, a expressão de *ikkβ* normaliza-se em relação ao macrófago WT, enquanto *nf-kb* tem sua expressão reduzida. Este pode ser um mecanismo de autorregulação da célula visto que a inflamação, neste caso, aparenta ser crônica dado o modelo deletado para *fabp4* (**Figura 5**).

Ainda em relação ao fator de transcrição NF- κ B, ressalta-se que o mesmo é crucial para a polarização de macrófagos para o fenótipo M1, com capacidade de ativar genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12p40, e a enzima COX-2 (LIU et al., 2017). A ativação do NF- κ B em macrófagos é desencadeada por vários sinais, incluindo o reconhecimento de patógenos através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e a exposição a citocinas pró-inflamatórias. Na polarização M1, este fator atua na ativação por PRRs, na indução da expressão de genes pró-inflamatórios, como o HIF-1 α , que induz a expressão da iNOS (óxido nítrico sintase induzível), um dos marcadores característicos dos macrófagos M1 (OKADA et al., 2000; OREKHOV et al., 2019). Os níveis de expressão do fator em macrófagos *fabp4*-KO mantêm-se relativamente próximos aos níveis das células WT para os primeiros tempos, mas reduzem para 72h de cultura (**Figura 5**).

A expressão de *inos*, contudo, mantém estável em 1 e 72 horas de cultura, sendo que apenas para 48h, observa-se redução significativa no macrófago nocauteado (**Figura 5**). Tal fato pode ser explicado pela complexidade da regulação de iNOS, seja pela própria proteína c-FOS, capaz de inibir sua expressão, como por *nf-kb*, aumentado na condição de 48h, podendo levar à indução tardia de *inos* na ausência de FABP4, caracterizado como um ambiente anti-inflamatório (MAKOWSKI et al., 2005; OREKHOV et al., 2019).

Finalmente, outra alteração observada refere-se aos níveis de transcritos de *il-10*, com aumento significativo da expressão apenas para 1h (**Figura 5**). Dados da literatura indicam que esta interleucina pode ser ativada com o estímulo de fagocitose de células apoptóticas (CHUNG et al., 2008), evento que pode ter se dado após a diferenciação e descolamento das células para plaqueamento e cultivo por 1h.

Após conhecermos os perfis de expressão de alguns genes nas condições de cultivo estabelecidas, amostras de cada um dos grupos foram investigadas quanto ao perfil metabolômico em colaboração com o grupo de pesquisa da Dra. Ana Valéria C. Simionato (IQ-UNICAMP). Inicialmente, os dados obtidos foram referentes a macrófagos não infectados, comparando-se o grupo *fabp4*-KO com WT nos tempos de 1, 48 e 72 horas. Para avaliação dos perfis metabolômicos, foram obtidos gráficos de PCA (*Principal Component Analysis*) e PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*) para análise de possíveis separações das amostras entre os grupos (**Figura 6**).

Na análise de componentes principais (PCA), os pares de componentes principais utilizados para visualização e interpretação dos dados variam em sua capacidade de explicar a variabilidade total do conjunto de dados. O par PCA 1 *versus* 2 é geralmente o mais informativo, pois os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) capturam a maior parte da variância dos dados. Por isso, a visualização neste plano é a que melhor representa a estrutura global do conjunto analisado. No nosso caso, esta combinação de análises não foi possível por uma limitação amostral, levando-nos a analisar outros pares de PCA.

Quando se analisam pares como PC 1 *versus* 4, 2 *versus* 4 ou 3 *versus* 4, observa-se uma redução na proporção de variância explicada. Isso significa que esses componentes capturam porções menores da variabilidade original, o que torna suas contribuições menos relevantes em termos de interpretação estatística. Ainda que possam revelar padrões ou agrupamentos sutis, esses pares de componentes tendem a representar variações residuais ou mais específicas, sendo, portanto, menos informativos do que a análise baseada nos dois primeiros componentes principais. Ainda assim, as análises foram seguidas por PLS-DA, uma vez que esta leva em conta as categorias (grupos) dos dados durante a projeção, buscando maximizar a separação entre as classes (**Figura 6**). Baseados nesta informação, seguimos com a obtenção dos VIP (*Variable Importance in the Projection*) scores para destacar possíveis metabólitos com maior contribuição na diferença entre os grupos, sendo de maior importância quanto maior o valor, partindo-se de $VIP > 2,0$ (**Figura 7**).

Ainda na **Figura 7**, são mostrados *volcano plots* que, diferentemente da análise de *VIP score*, tem como critério principal a análise da significância estatística associada à magnitude (*fold change*). Finalmente, dentre os metabólitos anotados,

foram considerados parâmetros relevantes para comparação entre os dois grupos: diferença significativa, valor de *fold change* e identificação. Neste caso, apenas um metabólito foi obtido nestas condições; o 4-ácido aminobutírico (GABA) que mostrou-se 4.7x aumentado no grupo KO em 1h (**Quadro 4, Figura 8**).

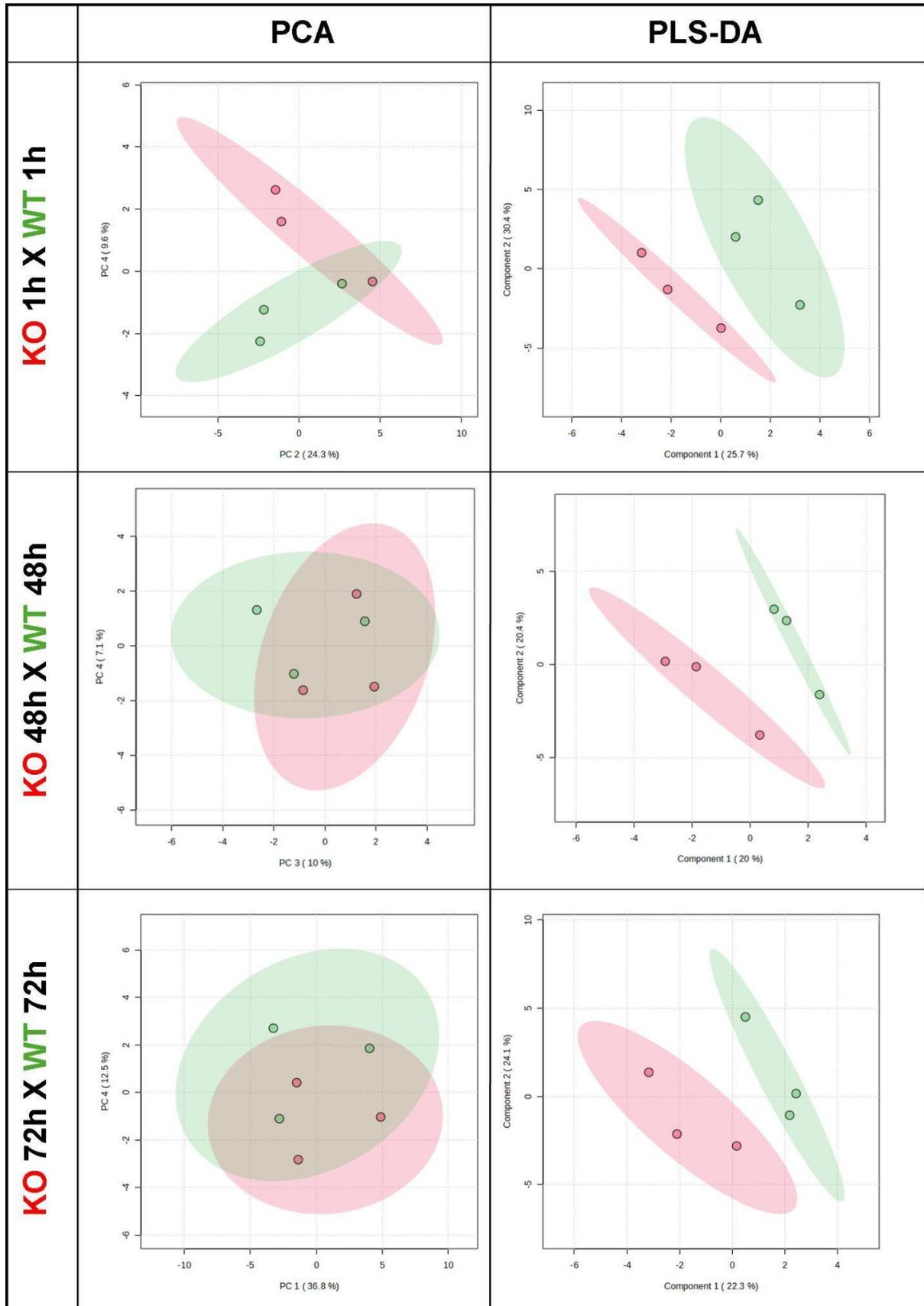


Figura 6: Análise multivariada por PCA e PLS-DA dos metabólitos referentes aos grupos de macrófagos WT e KO. As fileiras representam os grupos representados em diferentes tempos (1, 48 e 72h), sendo em vermelho, os pontos referentes ao grupo *fabp4*-KO (KO) e, em verde, ao grupo WT.

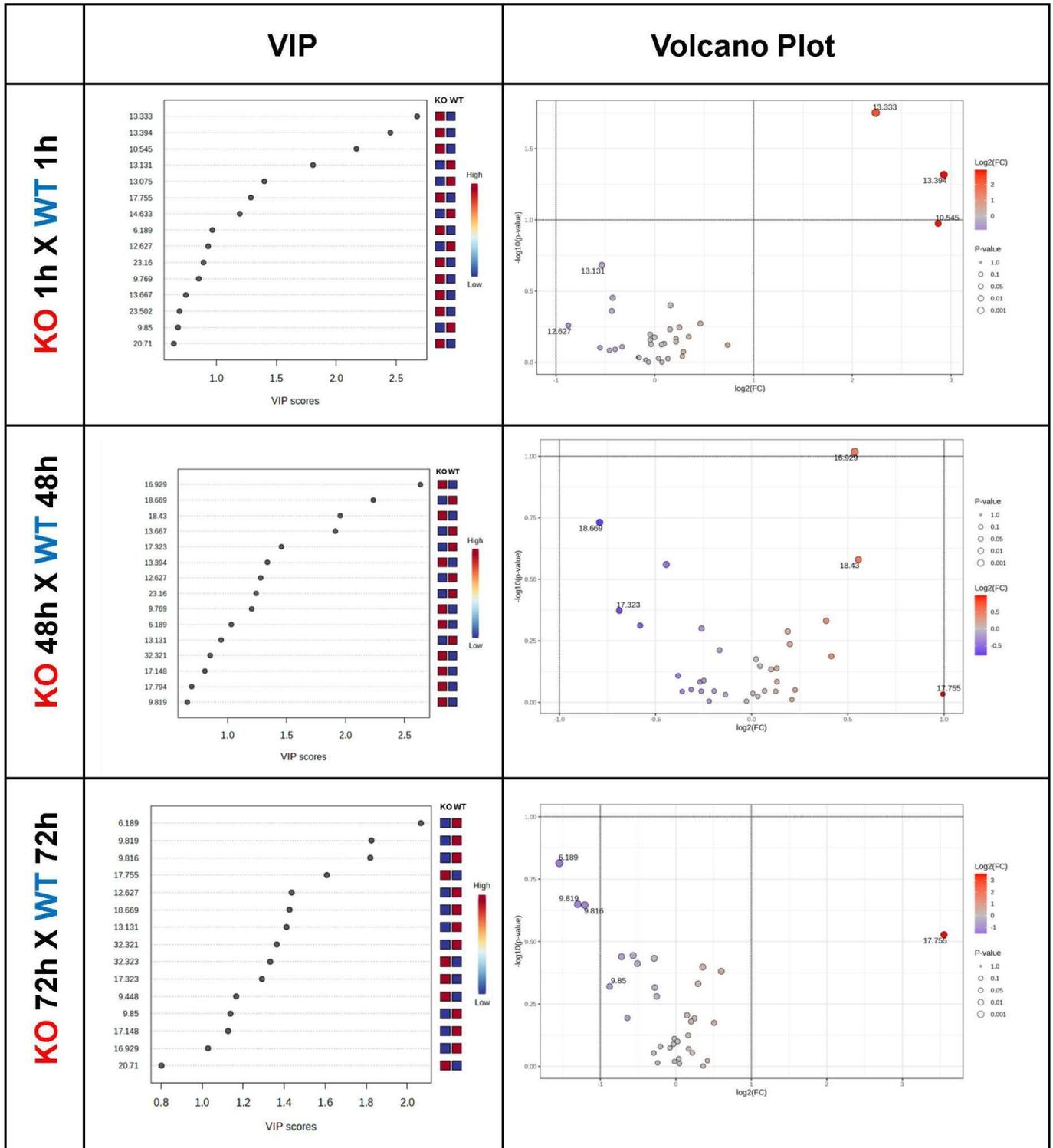


Figura 7: Gráficos de VIP score e Volcano Plot dos metabólitos anotados de macrófagos WT e *fabp4*-KO (KO). As fileiras representam os grupos nos diferentes tempos, sendo em vermelho o grupo KO e em azul, o grupo WT. Na primeira coluna estão os gráficos de VIP score sendo cada ponto um metabólito anotado acompanhado de *heatmap* para KO e WT. Coluna da direita: *Volcano plots* dos metabólitos anotados.

Quadro 4: Metabólitos anotados referentes à comparação entre macrófagos *fabp4*-KO (KO) e WT nos períodos de 1, 48 e 72h.

Combinações entre KO e WT	t.r	Identificação	Fold Change >2	Test-T (0.1/RAW)	Valor de p	Via metabólica
KO 1h X WT 1h	13,394	-	7,6112	S	0,048233	-
	10,545	Butanedioic acid, 2TMS derivative	7,312	NS	-	-
	13,333	4-Aminobutyric acid, N,N,O-tri(trimethylsilyl) derivative	4,7189	S	0,017733	Metabolismo de glutamato/succinato
KO 48h X WT 48h	16,929	L-Alanine ethylamide, (S)-	-	S	0,096006	-
KO 72h X WT 72h	17,755	[5780] D-sorbitol [17.898]	11,723	NS	-	-
	6,189	Arsenous acid, tris(trimethylsilyl) ester	0,34309	NS	-	-
	9,819	[3857] DL-2-amino-3-phosphonopropionic acid [16.226]	0,40649	NS	-	-
	9,816	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	0,43362	NS	-	-

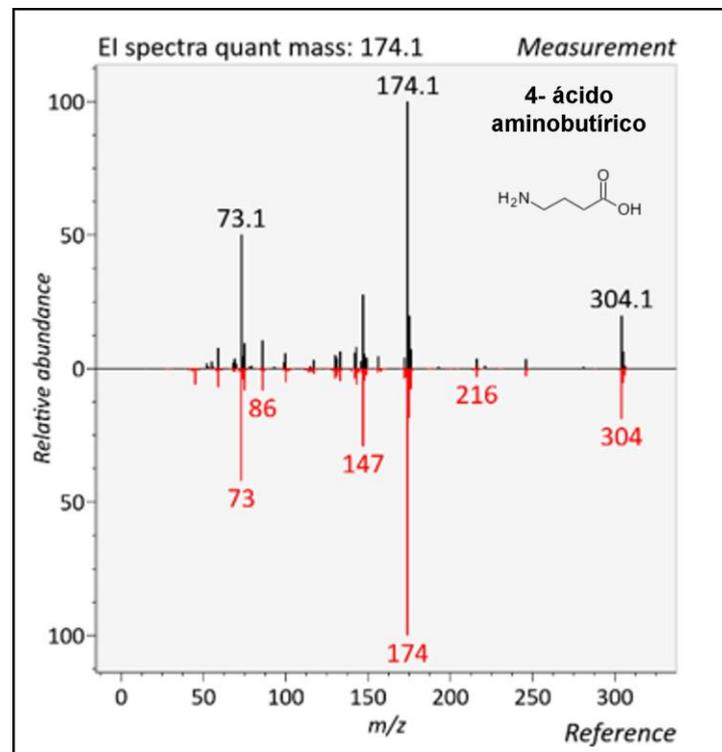


Figura 8: Espectrometria de massas e identificação do metabólito 4-ácido aminobutírico (GABA) com respectiva estrutura química.

O aumento do metabólito GABA em macrófagos deficientes em FABP4 sugere uma reprogramação significativa de vias metabólicas centrais, especialmente envolvendo glutamato, succinato e citrato. Embora tradicionalmente conhecido como um neurotransmissor, o GABA participa de uma via metabólica alternativa - o *shunt* do GABA – intimamente relacionada ao ciclo do TCA, à glicólise e à lipogênese nos macrófagos (FU et al., 2022). O GABA é derivado do glutamato por meio da enzima glutamato descarboxilase (GAD), e pode ser convertido em succinato através da

rota: glutamato → GABA → succinato semialdeído → succinato. Este último, além de ser um intermediário do TC, atua como um sinalizador inflamatório, promovendo a estabilização do fator HIF-1 α e a ativação de vias glicolíticas em macrófagos ativados (LUKYANOVA et al., 2018; FU et al, 2022).

Nos macrófagos deficientes em FABP4, foi observado um aumento significativo de GABA exclusivamente em 1h após cultivo em meio com suplementação de apenas 10% de SFB. Nos tempos mais tardios, não foi mais detectado esse metabólito, inclusive sendo tempos em que não houve substituição por meio fresco. Este dado sugere que o aumento de GABA pode ser uma resposta transitória e precoce, possivelmente relacionada à adaptação inicial do metabolismo celular à ausência de FABP4 nas condições de um novo meio de cultura após o período de diferenciação.

Uma hipótese é de que, nas fases iniciais, haja maior conversão de glutamato em GABA como forma de compensar a perda de controle sobre o metabolismo lipídico e redox, provocada pela ausência da proteína. Com o avanço do tempo, entretanto, as células podem redirecionar esse metabolismo ou ativar mecanismos compensatórios que suprimem a via do GABA, ou ainda consumir rapidamente esse metabólito, impedindo sua detecção posterior.

Sabe-se que a deficiência de FABP4 leva à polarização para um fenótipo anti-inflamatório (M2), caracterizado por maior uso de fosforilação oxidativa e menor dependência da glicólise. Assim, o aumento inicial de GABA poderia refletir uma fase de transição metabólica, onde o glutamato é temporariamente canalizado para o *shunt* do GABA, resultando em produção de succinato e em modulação do ciclo do TCA, impactando, por consequência, a disponibilidade de citrato para a lipogênese (YAN e HORNG, 2020). De fato, a ausência de FABP4 tem sido associada a acúmulo lipídico intracelular, alterações na lipogênese e redução na expressão de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (XU et al., 2022). Além disso, a literatura aponta que o GABA, além de modular respostas inflamatórias, pode favorecer o aumento da expressão de ABCA1 e reduzir de CD36, promovendo o efluxo de colesterol e, possivelmente, ajudando a prevenir o acúmulo excessivo de lipídios intracelulares (YANG et al., 2014); dados concordantes com os nossos mostrados na **Figura 5**. Estudos adicionais corroboram esse papel regulador do GABA.

Por fim, o aumento precoce de GABA nos macrófagos *fabp4*-KO pode representar uma adaptação metabólica inicial frente à perda da proteína. O restauro dos níveis de GABA nos tempos mais tardios pode indicar uma rápida utilização metabólica ou regulação negativa da sua produção, reforçando a ideia de que o GABA atua de maneira pontual e estratégica na fase inicial de adaptação de cultivo na deficiência de FABP4.

5.3 *Leishmania amazonensis*

5.3.1 Infecção *in vitro*

Após determinarmos os perfis de expressão gênica dos genes de interesse de macrófagos WT e *fabp4*-KO não infectados, foram realizadas infecções *in vitro* com amastigotas de *L. amazonensis* na proporção 2 parasitos por macrófago por 1, 48 e 72h.

A contagem das células resultou nos gráficos de taxa de infecção (porcentagem de macrófagos infectados) e de número de parasitos a cada 100 macrófagos infectados (**Figura 9**). É possível observar que após 48h, há aumento da taxa de infecção e número de parasitos por macrófago. Observa-se redução destes números em 72h, mas ainda condizentes com infecções que obtemos na rotina do laboratório com a cepa PH8 e macrófagos oriundos de camundongos C57/BL6, com perfil mais direcionado à menor suscetibilidade aos parasitos, principalmente em infecções *in vivo*, que comumente tendem a ser mais controladas quando comparadas àquelas em hospedeiros da linhagem BALB/c (VELASQUEZ et al., 2016). Por outro lado, a capacidade replicativa dos parasitos em animais *fabp4*-KO mostrou-se aumentada de forma tempo-dependente (**Figura 9B**).

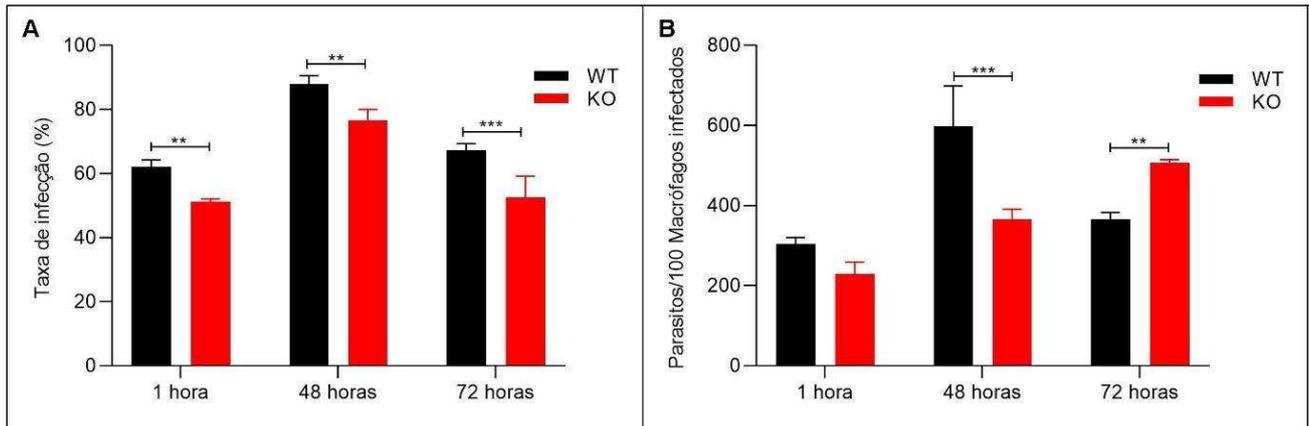


Figura 9: Infecção de macrófagos com *L. amazonensis*. Macrófagos diferenciados foram obtidos de camundongos C57/BL6 WT (barras pretas) e *fabp4*-KO (KO: barras vermelhas) e infectados com amastigotas axênicos de *L. amazonensis* (MOI = 2) por 1, 48 e 72h. **A.** Taxa de infecção representada pela porcentagem de macrófagos infectados e **B.** Número de parasitos a cada 100 macrófagos infectados. Os valores foram obtidos por contagem em microscópio óptico de triplicatas de infecção em lamínulas fixadas e coradas com kit Instant Prov. **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,0005$ (Student-T test).

Paralelamente, amostras de cada condição foram analisadas quanto à incorporação de Oil Red O, um corante lipofílico utilizado para detectar e visualizar lipídios neutros e amplamente empregado para evidenciar o acúmulo de gotículas lipídicas (MENDES et al., 2022). Para isso, a semi-quantificação do corante em culturas pré-fixadas em PFA a 4% foi realizada após incubação com Oil Red O e extração lipídica com isopropanol a 50%, sendo a densidade ótica dos extratos analisada em espectrofotômetro a 492 nm. Amostras pareadas também foram coradas com Giemsa após incubação com Oil Red O para observação em microscópio óptico e análise qualitativa em 72h. Ainda que se trate de uma metodologia de baixa sensibilidade, notou-se acúmulo de Oil Red O em infecções de 48 e 72h em macrófagos *fabp4*-KO (**Figura 10A, B**), esperado para células capazes de acumular lipídios neutros, inclusive ésteres de colesterol (YOREK et al., 2024).

De posse destas informações, análises dos níveis de transcritos e de proteínas, na presença de *L. amazonensis*, foram conduzidas conforme descrito a seguir.

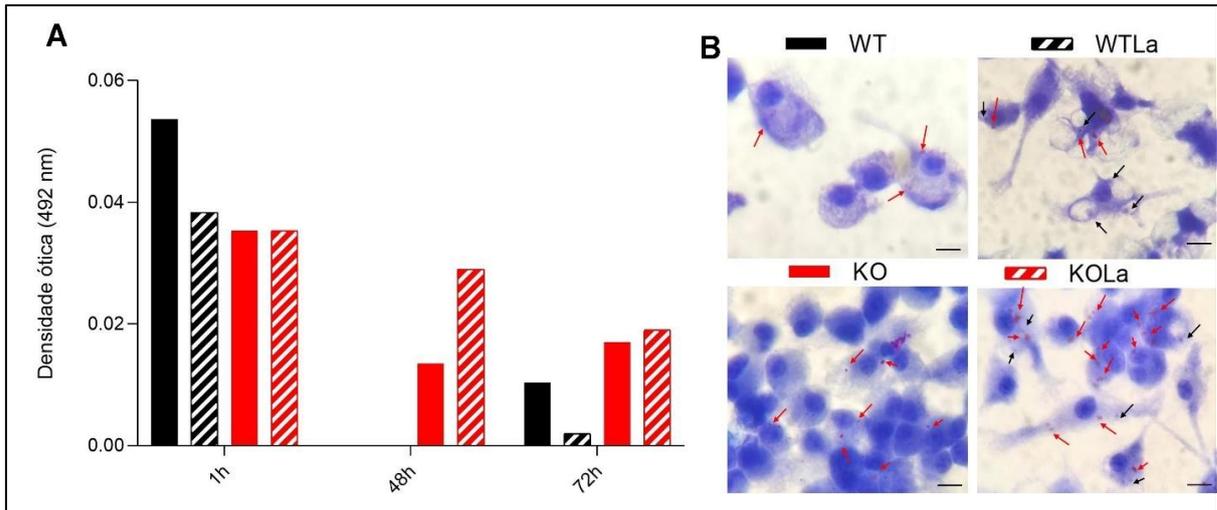


Figura 10: Análise semiquantitativa e qualitativa de Oil Red O em infecções por *L. amazonensis*. Culturas de macrófagos foram fixadas em PFA a 4% e coradas com Oil Red O para posterior extração com isopropanol 50% e quantificação da densidade óptica em espectrofotômetro a 492 nm. Foram realizados também o cultivo e infecção em lamínulas que foram fixadas, coradas com Oil Red O e Giemsa. **A.** Gráfico de densidade óptica. **B.** Imagens representativas de células WT e *fabp4*-KO infectadas ou não com *L. amazonensis* para 72h. Preto: WT; preto listrado: WT infectado; vermelho: *fabp4*-KO; vermelho listrado: *fabp4*-KO infectado. Barra = 10 μ m.

5.3.1.1 Expressão gênica

Para avaliação dos genes de interesse, parte das amostras foram utilizadas para extração de RNA, seguido da síntese de cDNA e análise por PCR quantitativo em tempo real. Os dados foram normalizados inicialmente com o gene constitutivo *hprt1*, conforme apresentado na **Figura 5**. Além disso, após a normalização, foram consideradas amostras controle os macrófagos WT não infectados para cada um dos respectivos tempos. Nos gráficos apresentados a seguir, a linha pontilhada refere-se ao controle considerado com expressão normalizada para 1. Os grupos com valores acima de 1 foram considerados com expressão aumentada e, quando abaixo de 1, expressão reduzida (**Figuras 11-13**).

Na **Figura 11** é possível observar a expressão de genes envolvidos no início da via (*cd36*, *fabp4* e *ppar- γ*) que culmina com o efluxo de colesterol. Foi novamente incluído o gene *fabp5*, por conta da possível compensação no contexto de ausência de FABP4, explicado pelo fato das variantes de FABPs além possuírem domínios conservados, como o domínio beta-*barrel*, com cavidade hidrofóbica para ligação de lipídios, e um motivo alfa-helicoidal que regula o acesso ao sítio de ligação. Essa estrutura comum justifica suas funções semelhantes no transporte lipídico e na

regulação de inflamação e sinalização nuclear, apesar de diferenças na afinidade por ligantes (FURUHASHI e HOTAMISLIGIL, 2008).

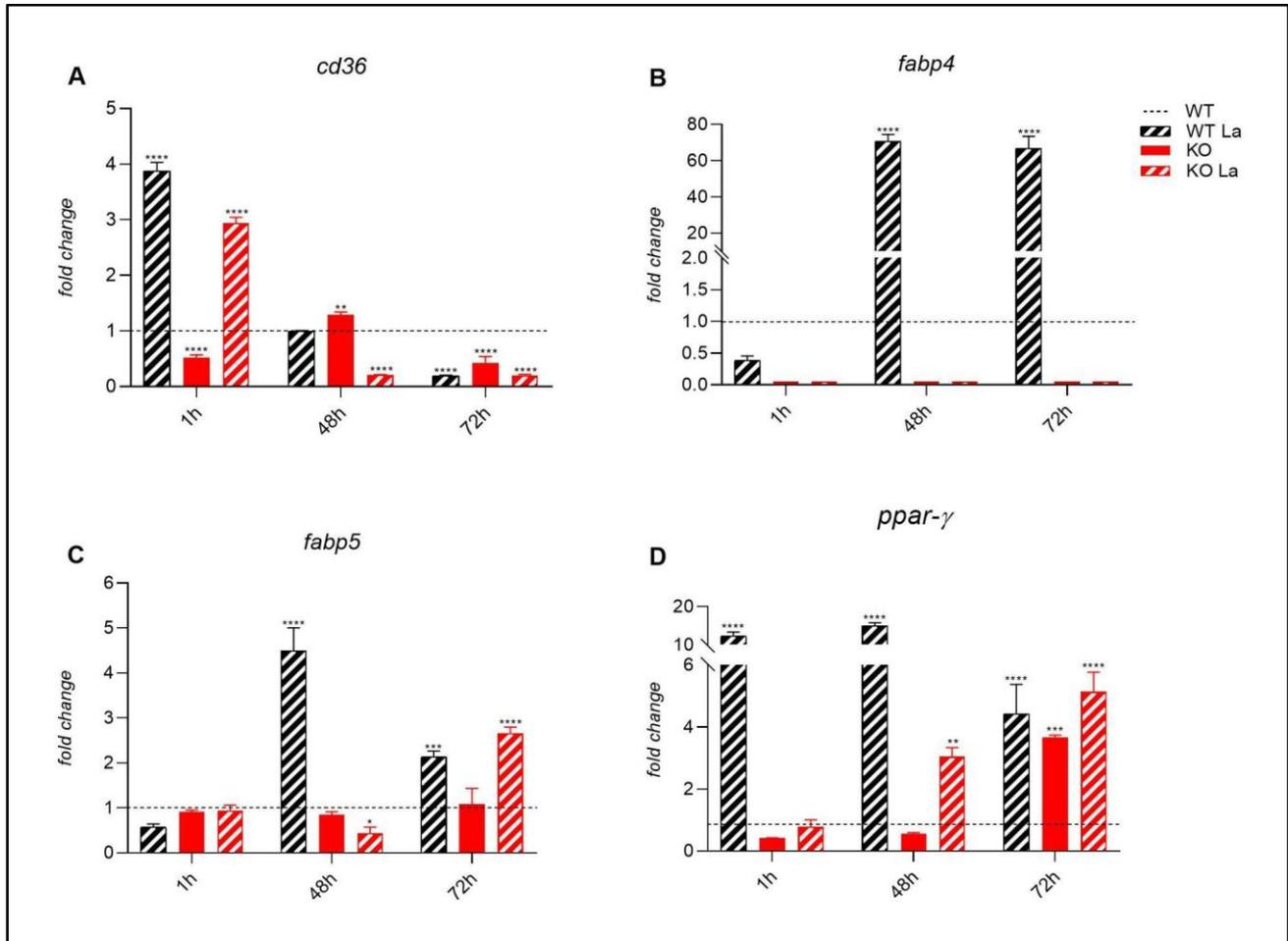


Figura 11: Expressão de *cd36* (A), *fabp4* (B), *fabp5* (C) e *ppar-γ* (D) em macrófagos WT e KO infectados ou não com amastigotas de *L. amazonensis*. Macrófagos cultivados após 1, 48h e 72h, derivados de camundongos *fabp4*-KO e WT, foram infectados ou não com *L. amazonensis* e utilizados para extração de RNA e síntese de cDNA. Foi analisada a expressão de *cd36* (A), *fabp4* (B), *fabp5* (C) e *ppar-γ* (D) em relação ao gene endógeno *hprt1*. A linha pontilhada representa a expressão de macrófagos WT não infectados. A barra preta listrada representa a expressão de macrófagos WT infectados, a vermelha, macrófagos KO não infectados e a vermelha listrada, macrófagos KO infectados. Os resultados correspondem à média \pm DP de triplicata biológicas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ e **** $p < 0,0001$ (teste Two-way ANOVA, Dunnett's multiple). Nas comparações para as quais não há asteriscos, a diferença não foi significativa.

Ao longo do tempo de infecção, tanto o grupo *fabp4*-KO, quanto o WT infectados apresentam pico de expressão de *cd36* após 1h de infecção, com redução até 72h. O grupo nocaute não infectado mantém uma expressão baixa, com um aumento apenas em 48h, como discutido no item 5.2 (Figuras 5, 11A). Dentre

as funções da proteína CD36 estão o transporte e a sinalização de ácidos graxos, ativação de células inflamatórias, além da participação na biossíntese de vacúolo parasitóforo. Estudos mostram ainda o acúmulo desta proteína em regiões vacuolares intimamente associadas à *L. amazonensis* (OKUDA et al., 2016). Desta forma, justifica-se o incremento da expressão gênica observado ao início da infecção, induzido na presença do parasito inclusive na ausência de FABP4, dada a recente internalização de *L. amazonensis*. Nota-se, contudo, que o incremento de CD36 não parece ser relevante para tempos posteriores, ainda que haja aumento de vacúolos parasitóforos na presença de *Leishmania* mesmo que mais abundantes em macrófagos *fabp4*-KO, como apresentado na **Figura 6**.

Para tempos mais longos, foi observado aumento significativo da expressão de *fabp4* em macrófagos WT infectados (**Figura 11B**). Como os macrófagos KO são nocauteados para *fabp4*, não houve expressão para estes grupos, conforme esperado. Além de corroborar dados anteriores obtidos pelo grupo de pesquisa, trata-se de um resultado condizente com o aumento inicial de *cd36*. Uma vez havendo aumento de RNAm (RNA mensageiro) para a produção de uma proteína que permite a entrada de ácidos graxos, torna-se necessário o aumento da expressão da proteína transportadora dessas moléculas. Em macrófagos, a FABP4 atua na regulação da inflamação através do aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e no metabolismo lipídico (LIANG et al., 2018) e é sabido que *Leishmania* modula o ambiente do vacúolo parasitóforo para obtenção de ácidos graxos, visto que a forma amastigota utiliza preferencialmente os ácidos graxos como fonte de energia em virtude do aumento da β -oxidação (HART e COOMBS, 1982; KAGAWA et al., 2023; SOOD et al., 2024).

A expressão de *fabp5* foi incluída para verificar uma possível compensação no grupo KO. Porém, observamos aumento significativo apenas em 72h para o grupo infectado. Já o grupo WT mostrou aumento de transcritos entre 48 e 72h, embora não comparável ao de *fabp4*, apesar de também ser significativo (**Figura 11C**). Em macrófagos, a FABP5 possui papel crucial na resposta inflamatória, regulando sua intensidade através da ativação de vias como do NF- κ B. Somado a isso, atua em conjunto com PPAR- β/δ ativando genes anti-inflamatórios (GUO et al., 2021; HOU et al., 2022). Dessa forma, seu aumento no grupo KO pode compensar

parcialmente *fabp4*, mas no caso do grupo WT, pode estar envolvida em uma eventual modulação da resposta inflamatória da célula hospedeira.

Já em relação ao *ppar-γ*, observa-se o aumento da expressão após todo o período de infecção no grupo WT, porém, com redução após 72h. O grupo KO infectado, por sua vez, apresenta este aumento após 48 e 72h de forma gradativa. Este padrão não é observado no grupo KO não infectado, no qual possui um aumento significativo apenas após 72h (**Figura 11D**), como discutido no item 5.2.

Conforme descrito anteriormente, em adipócitos, as proteínas PPAR- γ e FABP4 possuem uma relação de *feedback* negativo, no qual a FABP4 pode promover a degradação de PPAR- γ . Porém, em macrófagos, a FABP4 pode ativar PPAR- γ em algumas circunstâncias, como no início da diferenciação de macrófagos. Contudo, em macrófagos diferenciados, ambos possuem funções interligadas durante sua polarização (GARIN-SHKOLNIK et al., 2014; BOß et al., 2015; BERVEJILLO et al., 2020). Desse modo, os dados de PCR em tempo real podem indicar tendência de polarização dos macrófagos WT infectados de M1 \rightarrow M2 inicialmente e, no caso do grupo KO, é possível observar modulação mais tardiamente, coincidente com o aumento da quantidade de parasitos intracelulares. Desse modo, os dados de PCR em tempo real podem indicar tendência de polarização (**Figura 6**).

Em sequência, na **Figura 12A**, verifica-se que a expressão de *lxr* é aumentada inicialmente nos grupos WT e KO e, após 48h, exclusivamente no grupo KO. Sabe-se que a proteína LXR é um fator de transcrição que é ativado por oxisteróis, metabólitos bioativos do colesterol, importantes durante a regulação do metabolismo lipídico e efeito anti-inflamatório no macrófago. Dados indicam que na infecção com *L. infantum*, a ausência desta proteína está relacionada à redução da carga parasitária (BRUHN et al., 2010; MUTEMBEREZI et al., 2016). Dessa forma, o aumento após 1 hora de infecção pode ser atribuído à presença do parasito, que aumenta em número significativamente (**Figura 9**). Porém, nos tempos seguintes não há aumento para o grupo WT, e a taxa de infecção reduz após 72h; diferentemente do grupo KO, no qual a ausência de FABP4 parece permitir o aumento de *lxr*.

Em relação ao transportador ABCA1, observamos aumento nos níveis de transcritos no grupo WT infectado após 1h e aumento, embora menos significativo, para o grupo KO infectado após 1 e 48h. Estudos com macrófagos infectados com *L.*

donovani indicam que o parasito reduz a expressão de *abca1* para maior acúmulo de colesterol, podendo ser recrutado pelo parasito (PRAKASH e RAI, 2022). Ao relacionar esses dados com os resultados obtidos na presente tese, o primeiro contato com o parasito parece estimular a síntese de RNA de todos os genes relacionados à entrada de ácidos graxos ao efluxo de colesterol, provavelmente em razão da entrada e início do estabelecimento do parasito que utiliza tais macromoléculas. De fato, há aumento de *abca1* após 1h de infecção, porém, logo após 48h observa-se a redução no grupo WT, revelando influência da presença do patógeno. Já no grupo KO, essa redução ocorre apenas após 72h, indicando o desbalanço da via na ausência de *fabp4*.

Uma forma utilizada pelos macrófagos para combater patógenos intracelulares é a produção de óxido nítrico (NO) mediada pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A indução da enzima ocorre por citocinas inflamatórias e a produção de NO interfere negativamente na sua multiplicação (DE TREZ et al., 2009; OLEKHNOVITCH e BOUSSO, 2015). Assim, o aumento ao longo de todo período de infecção do grupo WT corrobora os dados descritos na literatura. Além disso, após 72h de infecção, observamos tendência de redução da quantidade de parasitos. Porém, para o grupo KO, não observamos alteração na expressão, o que pode estar associado ao aumento gradativo da carga parasitária neste grupo.

Já na **Figura 12D**, observa-se um aumento da expressão de *il-10* após 48h de infecção no grupo WT, podendo explicar a tentativa de controle da proliferação parasitária (**Figura 9**), em um modelo frequentemente associado ao perfil M1. Já o grupo KO apresenta expressão aumentada após 1 e 48h de infecção. Ao contrário de iNOS, a redução de IL-10 está relacionada à ativação de macrófagos, contribuindo para a persistência de *Leishmania*. Sua atividade consiste em inibir a síntese de citocinas inflamatórias, fato interessante quando observamos que há aumento significativo da expressão após 1 e 48h para macrófagos KO infectados, justamente o grupo com aumento da carga parasitária e expressão basal de *inos* (KANE e MOSSER, 2001; MURPHY et al., 2001). Já para o grupo controle infectado, verifica-se o aumento significativo após 48h, seguido de redução, em contraste aos altos níveis de *inos*.

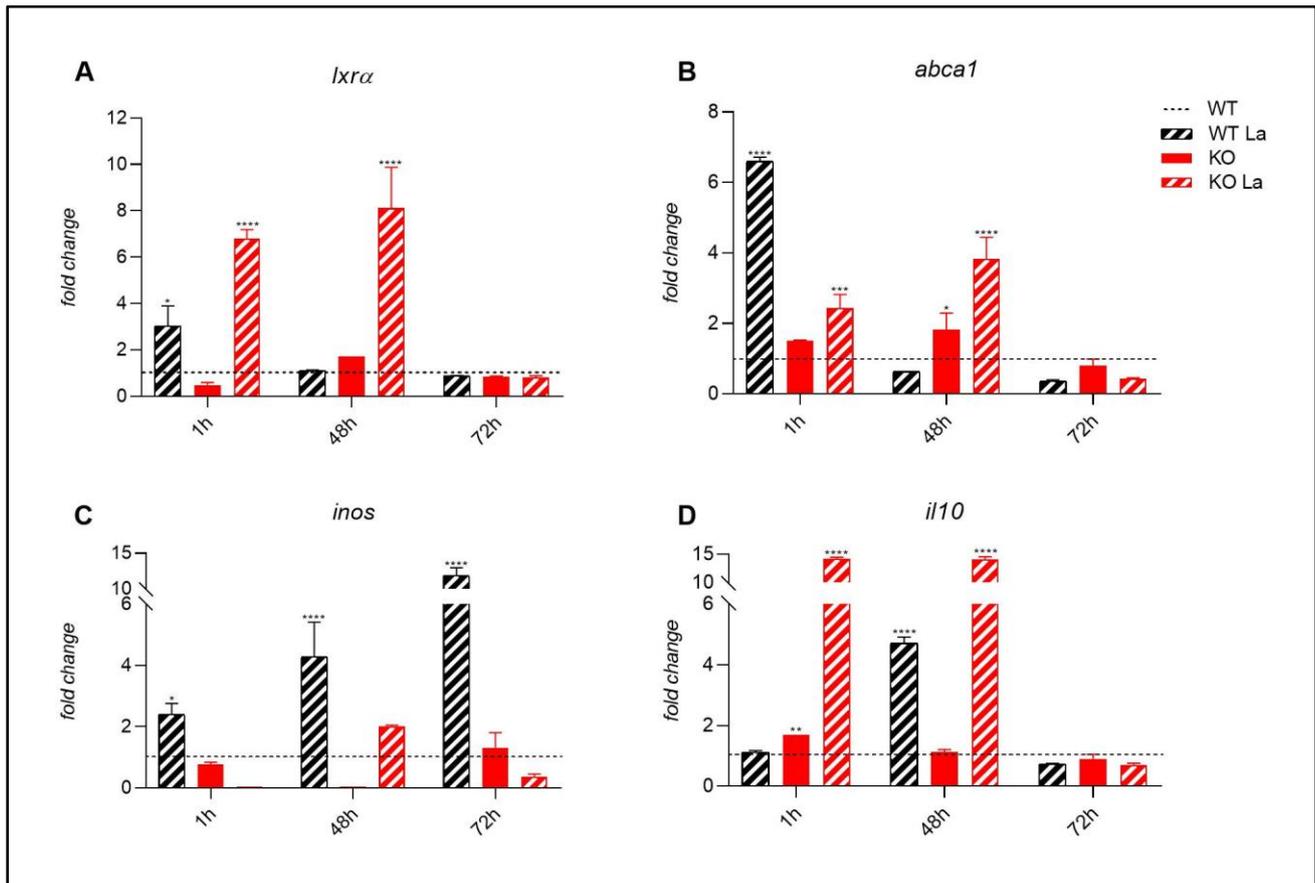


Figura 12: Gráficos de expressão de *lxr-α* (A), *abca1* (B), *inos* (C) e *il-10* (D) em macrófagos WT e KO infectados ou não com amastigotas de *L. amazonensis*. Macrófagos cultivados nas mesmas condições descritas na legenda da Figura 11. A linha pontilhada representa a expressão de macrófagos WT não infectados. A barra preta listrada representa a expressão de macrófagos WT infectados, a vermelha, macrófagos KO não infectados e a vermelha listrada, macrófagos KO infectados. Os resultados correspondem à média \pm DP de triplicata biológicas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ e **** $p < 0,0001$ (teste Two-way ANOVA, Dunnett's multiple). Nas comparações para as quais não há asteriscos, a diferença não foi significativa.

Finalmente, a **Figura 13** apresenta a expressão dos genes que codificam as proteínas ligadas à sinalização imune para a qual há forte influência da FABP4. A proteína JNK possui um papel importante na infecção por *Leishmania*, podendo contribuir tanto para sua eliminação quanto para sua sobrevivência. Estudos com *L. major* indicam que a deficiência de *jnk* contribui para a progressão da doença, outros indicam que a ativação pode favorecer a sobrevivência do parasito através da redução da produção de iNOS e controle da autofagia em macrófagos (CONSTANT et al., 2000; GUHE e SINGH, 2025). Portanto, é uma via de caráter dicotômico e, quando se observa a expressão no grupo KO, identifica-se o aumento após 1 e 48h, coincidente com o aumento da carga parasitária e baixa expressão de *inos* (**Figuras**

9, 12C, 13A). No caso de macrófagos WT infectados, há tendência da sua expressão ser controlada e próxima aos níveis verificados na ausência de parasitos.

Na literatura não há estudos específicos associando IKK β e infecções por *Leishmania*, mas sabe-se que esta proteína atua na fosforilação de NF-kB que, por sua vez, é translocado para o núcleo onde ativa genes relacionados à inflamação. Além disso, tem papel relevante associado à prevenção da apoptose celular e, em infecções intracelulares, a proteína atua inibindo a resposta de ativação clássica do macrófago com polarização para M1 (FONG et al., 2008; ZHANG et al., 2023). Na **Figura 13B**, identificamos aumento da expressão de *ikkb* após 1 e 48h de infecção no grupo WT infectado, porém, há importante aumento após 48h no grupo KO infectado.

No caso da análise da expressão de *c-fos*, verificamos o seu incremento apenas após 1h de infecção para ambos os grupos infectados. Nandan e colaboradores relataram que infecções de macrófagos com *L. donovani* apresentam redução nos níveis de c-FOS (NANDAN et al., 1999). Em relação à resposta imune, essa proteína pode interagir com NF-kB e limitar a inflamação, além de reduzir IL-10. Pode ainda servir como substrato de IKK β e suprimir a atividade de monofosfato de adenosina cíclico intracelular (AMPc) e, conseqüentemente, a atividade pró-inflamatória (RAY et al., 2006; KOGA et al., 2009). Na ausência de *fabp4*, o aumento após 1h é superior ao grupo selvagem e pode representar uma modulação da própria célula para combater o patógeno apenas no período de estabelecimento da infecção (**Figura 13C**).

Por fim, outra proteína sabidamente modulada por *Leishmania* é o fator NF-kB. Sua expressão gênica é elevada no grupo WT infectado na primeira hora de infecção apenas, seguido por drástica redução ao longo do tempo (**Figura 13D**). Na ausência de FABP4, o aumento é significativo após 48h, relacionado ao incremento de JNK/IKK, que possivelmente pode estar associado a outros estímulos extracelulares e não ativação via lipídios carregados por FABP4 (**Figura 3B**). Estudos mostram que *L. amazonensis* e *L. donovani* reduzem a expressão de *nf-kb* para reduzir a ativação de genes pró-inflamatórios e favorecer sua sobrevivência na célula (GUPTA et al., 2017; LECOEUR et al., 2020). Para o grupo WT, após o primeiro contato com o parasito já na forma amastigota, a célula pode ativar a expressão de *nf-kb* para combatê-lo, porém, no grupo *fabp4*-KO essa resposta é mais tardia.

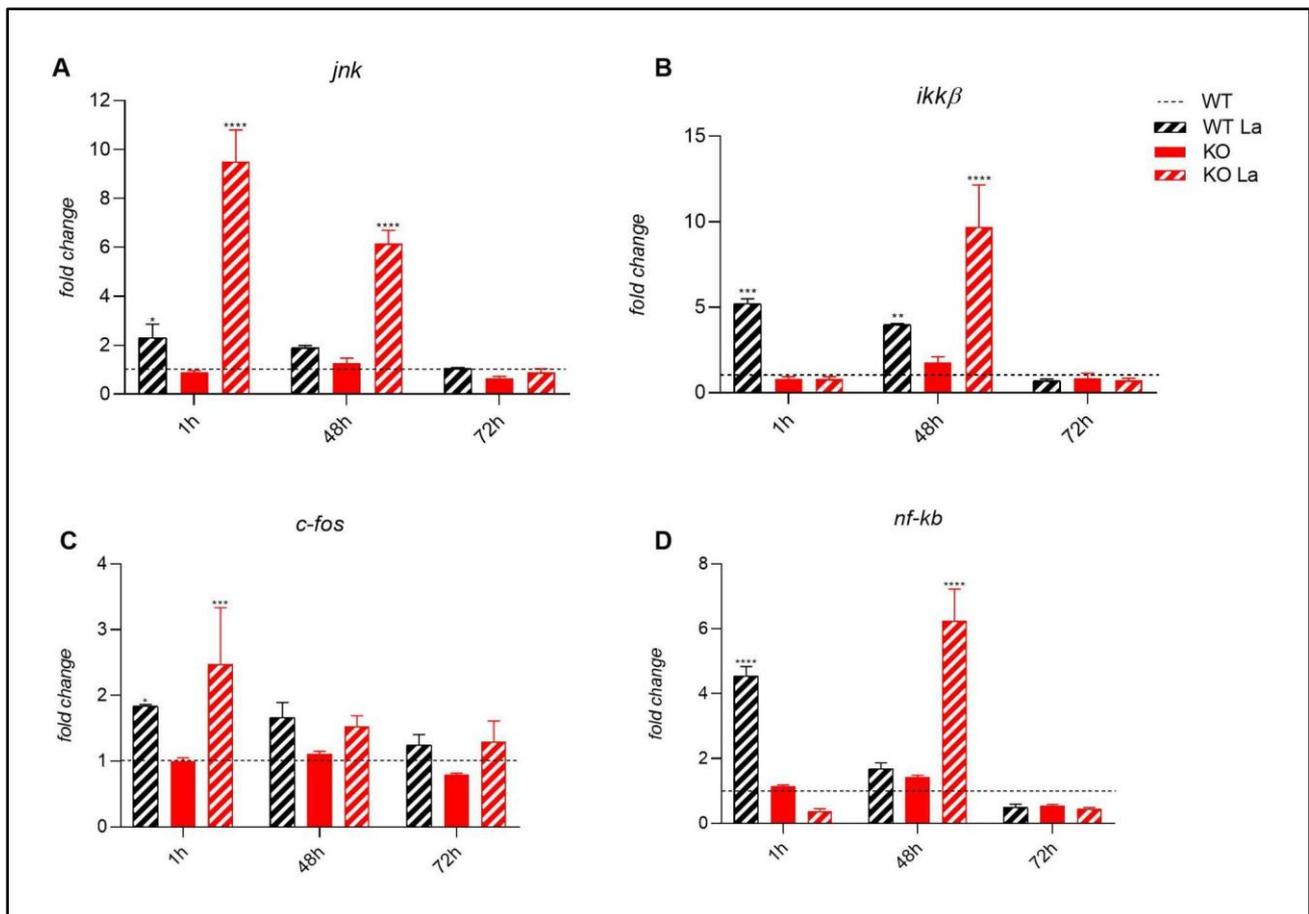


Figura 13: Gráficos de expressão de *jnk* (A), *ikkβ* (B), *c-fos* (C) e *nf-kb* (D) em macrófagos WT e KO infectados ou não com amastigotas de *L. amazonensis*. Macrófagos cultivados nas mesmas condições descritas na legenda da Figura 11. A linha pontilhada representa a expressão de macrófagos WT não infectados. A barra preta listrada representa a expressão de macrófagos WT infectados, a vermelha, macrófagos KO não infectados e a vermelha listrada, macrófagos KO infectados. Os resultados correspondem à média \pm DP de triplicata biológicas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; * $p < 0,0005$ e **** $p < 0,0001$ (teste Two-way ANOVA, Dunnett's multiple). Nas comparações para as quais não há asteriscos, a diferença não foi significativa.**

Dessa forma, os resultados de expressão dos genes citados mostraram que as células provenientes de camundongos selvagens apresentam uma regulação fina e aparentemente eficaz contra *Leishmania*, diferentemente das células de camundongos nocauteados, para as quais há desbalanço neste controle, podendo explicar o aumento da carga parasitária intracelular. Uma hipótese, portanto, para explicar o perfil observado é de que o parasito pode utilizar a FABP4 para controlar a resposta inflamatória exacerbada da célula hospedeira.

5.3.1.2 Abundância proteica

A partir de alíquotas da infecção, foram extraídas proteínas totais para realização de *Western Blot* e avaliação da abundância proteica. Foram utilizados géis a 6 e 15%. O gel mais concentrado foi utilizado para as proteínas pequenas e médias, enquanto o de 6%, para as proteínas maiores. A mesma membrana foi utilizada para observar todas as proteínas, através da remoção do anticorpo a cada incubação, podendo-se utilizar o mesmo controle, sendo ele a β -actina, uma proteína altamente conservada e amplamente utilizada como normalizadora.

Como esperado, FABP4 não foi detectada no grupo *fabp4*-KO, mas sua abundância no grupo WT não infectado foi maior em relação ao grupo infectado (**Figura 14A**), ainda que os níveis estejam próximos. No contexto de macrófagos deficientes em FABP4, a IL-10 pode desempenhar um papel compensatório, promovendo um fenótipo anti-inflamatório (M2) e facilitando a adaptação metabólica dessas células. O aumento transitório de transcritos de IL-10 observado na **Figura 12** pode estar relacionado à fagocitose de células apoptóticas, um evento conhecido por induzir a produção de IL-10 (SAXTON et al., 2021; CARLINI et al., 2023). Supõem-se que a IL-10, sendo uma citocina-chave na modulação da função e do metabolismo dos macrófagos, especialmente na ausência de FABP4, contribua para a manutenção da homeostase imunológica e prevenção de respostas inflamatórias exacerbadas.

CD36 está mais abundante nas infecções de *fabp4*-KO em 1h, contudo, seus níveis reduzem em relação às amostras correspondentes não infectadas (**Figura 14B**). Na ausência de FABP4, o perfil de expressão de RNA é correspondente aos níveis da proteína.

PPAR- γ , por sua vez, possui aumento de expressão gênica no grupo WT infectado quando comparado com WT não infectado durante todos os tempos avaliados. Já para o grupo *fabp4*-KO infectado, o aumento de expressão ocorre após 48 e 72h. Em relação à proteína, a abundância se mantém ao longo do tempo, porém aparenta ser mais intensa no grupo *fabp4*-KO infectado e não infectado (**Figura 14C,F**). Como discutido anteriormente, a principal função desta proteína envolve a regulação de genes envolvidos na captação e efluxo de lipídios. Dentre os genes regulados estão *cd36*, *fabp4*, *lxr- α* e, indiretamente, *abca1* (CHAWLA et al., 2001; REN et al., 2022). Dessa forma, seu aumento no grupo *fabp4*-KO infectado e

não infectado é explicado visto que parece ocorrer um desbalanço dessa via como um todo na ausência de FABP4.

A proteína LXR- α encontra-se mais abundante nos grupos não infectados, sendo que para o grupo WT infectado há pouca abundância durante todos os tempos analisados. Entretanto, o grupo KO infectado apresenta aumento em 48h, achado concordante com o aumento de transcritos observado após 1 e 48h de infecção (**Figura 14D**). Por se tratar de uma proteína ativada por PPAR- γ , seu aumento pode sofrer influência direta deste fator de transcrição (**Figura 3B**). Porém, é relevante salientar que o grupo WT infectado possui baixos níveis de LXR- α ao longo dos tempos de infecção, distintamente do grupo KO infectado, levando-nos a supor esta proteína parece não ser influenciada pela presença do parasito, mas sim pela ausência da FABP4.

ABCA1, proteína glicosilada, mostra-se mais abundante em todos os grupos infectados, curiosamente com detecção de dupla banda nestes grupos (**Figura 14E,F**). A presença de mais de uma banda em determinadas condições biológicas ainda não completamente conhecidas pode ser explicada por processos de regulação pós-transcricionais a níveis variáveis de glicosilação que podem levar a diferentes pesos moleculares (WELLINGTON et al., 2002) e, portanto, diferentes posições de bandas no gel. O aumento dos níveis do transportador para grupos infectados pode estar relacionado ao possível aumento de colesterol nessas células (**Figura 10**), condição regulada na presença de amastigotas intracelulares.

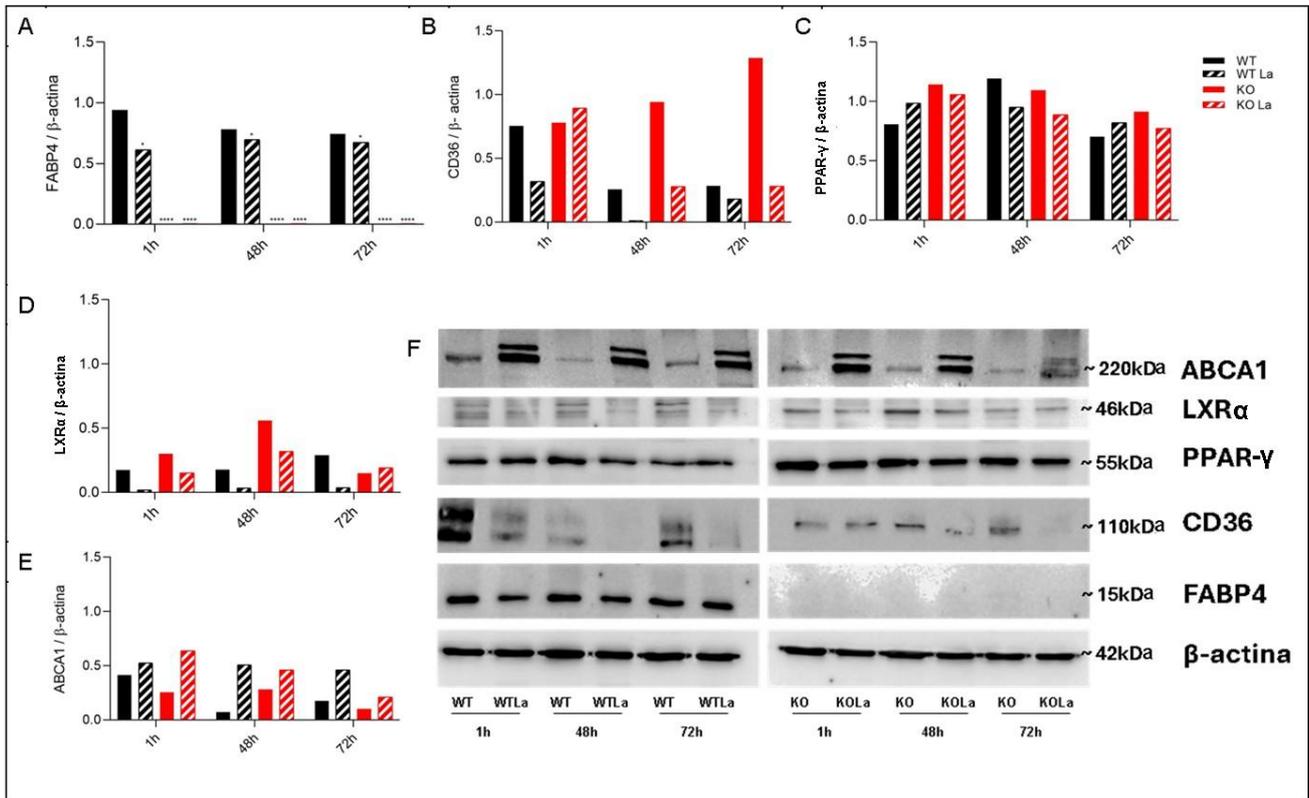


Figura 14: Gráficos e imagens da abundância proteica de FABP4, CD36, PPAR- γ , LXR- α e ABCA1 em relação a β -actina em amostras de macrófagos WT e KO infectados ou não com *L. amazonensis*. Macrófagos cultivados após 1 hora, 48 horas e 72 horas, derivados de camundongos KO e WT, foram infectados ou não com *L. amazonensis* e utilizados para extração de proteínas totais. Géis de poliácridamida de 15% para as proteínas β -actina, FABP4, PPAR γ e LXR, e 6% para ABCA1 e CD36. Letras A, B, C, D e E referentes aos gráficos de absorvância das proteínas FABP4, CD36, PPAR- γ , LXR- α e ABCA1 respectivamente. Letra F corresponde às imagens obtidas das proteínas em membrana de nitrocelulose nas condições e grupos estabelecidos.

Na **Figura 15A**, JNK está apresenta-se em pouca quantidade para todas as condições, com discreto aumento no grupo KO infectado após 48h e no grupo WT infectado após 72h. Tais resultados estão em concordância com a expressão aumentada nos grupos infectados após 1h. Em se tratando de uma proteína que pode ser ativada durante a polarização de macrófagos para M2, pode-se explicar o aumento no grupo KO após 48h (ARPA et al., 2023). Já NF- κ B mostrou-se praticamente indetectável, com sinal discreto de bandas após 48 e 72h, mas não significativo.

O complexo AP-1, por sua vez, reduz após 48 e 72h em todos os grupos avaliados, porém, a redução é significativa no grupo *fabp4*-KO infectado após todos os tempos analisados. Sua expressão gênica tem aumentos apenas nos grupos infectados após 1h. Como a abundância proteica está relativamente alta no início,

essa expressão pode ser oriunda da regulação macrofágica durante o final da diferenciação e início de adaptação em um novo meio de cultura. Porém, no caso do grupo *fabp4*-KO infectado, essa redução pode representar modulação do parasito para sua sobrevivência, visto que essa proteína está envolvida na via NF- κ B que, quando ativada, promove uma resposta pró-inflamatória (RAY et al., 2006).

Finalmente a proteína IKK β parece apresentar-se mais presente nos grupos nocautes em geral, mas entre os grupos não infectados e infectados, observa-se redução de seus níveis na presença do parasito (**Figura 15**). Pelo fato de se tratar de uma proteína que ativa NF- κ B, essa redução pode estar envolvida à modulação do parasito para sobrevivência no interior da célula (LECOEUR et al., 2020).

De maneira geral, as proteínas avaliadas não seguem necessariamente um padrão clássico de níveis compatíveis aos seus transcritos. Sabe-se que estas proteínas estão submetidas a intrincados processos de regulação pós-transcricional, via miRNAs, como no caso de CD36 e ABCA1, impactando na captação e efluxo de lipídios, e pós-traducional, onde CD36 e ABCA1 sofrem múltiplas modificações que controlam estabilidade, trânsito e atividade. FABP4 e IKK/JNK também são moduladas, embora com mecanismos não completamente conhecidos, mas aparentemente dependentes de ligação a ácidos graxos específicos e eicosanoides e, para JNKs, via fosforilação de c-Jun, aumentando sua atividade transcricional (KALLUNKI et al., 1996; JOHNSON e NAKAMURA, 2009; FURUHASHI et al., 2011; RAMIRÉZ et al., 2013; NICULITE et al., 2019). O complexo processo de regulação dual permite aos macrófagos ajustar rapidamente as funções lipídicas e inflamatórias de acordo com o ambiente, mantendo sua plasticidade metabólica e imunológica.

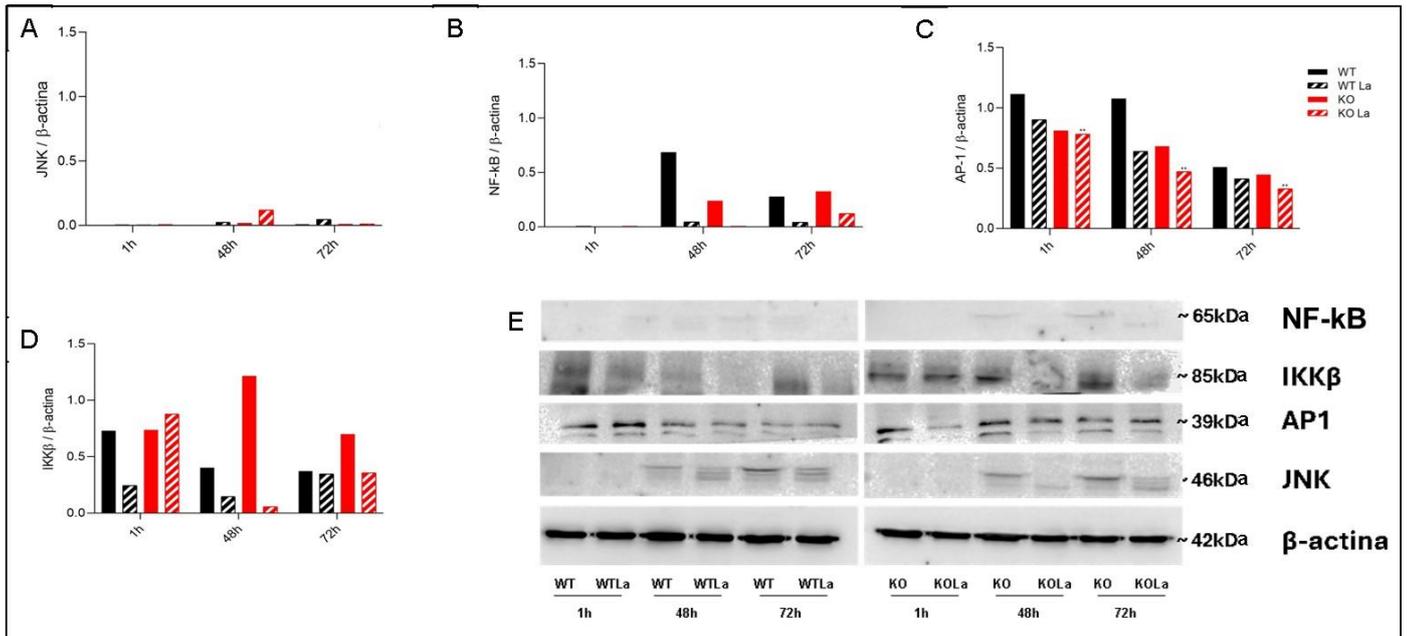


Figura 15: Gráficos e imagens da abundância proteica de JNK, NF-kB, AP-1 e IKK β em relação a β -actina em amostras de macrófagos WT e KO infectados ou não com *L. amazonensis*. Macrófagos cultivados de acordo com a descrição da Figura 10. Foram feitos géis de poliacrilamida de 15% para as proteínas β -actina, NF-kB, AP1 e JNK, e 6% para IKK β . Letras A, B, C e D referentes aos gráficos de absorvância das proteínas JNK, NF-kB, AP-1 e IKK β respectivamente. Letra E corresponde às imagens obtidas das proteínas em membrana de nitrocelulose nas condições e grupos estabelecidos.

5.3.1.3 Estudo da metabolômica de infecções intracelulares

Análises de metabolômica também foram conduzidas para os grupos infectados, sendo os resultados apresentados da mesma forma abordada anteriormente para macrófagos não infectados. Os dados de PCA, PLS-DA, VIP scores e *Volcano plots* são apresentados no Anexo A. Os metabólitos anotados que apresentaram diferenças significativas são mostrados nos **Quadros 5-7**. Inicialmente, foram comparados os grupos WT não infectado e infectado (WTLa) ao longo dos tempos de infecção (**Quadro 5**).

Quadro 5: Metabólitos anotados referentes à comparação entre macrófagos WT e WTLa nos períodos de 1, 48 e 72h. Na primeira coluna é apresentada a combinação entre as amostras, seguida do tempo de retenção (t.r.), da identificação do metabólito encontrado, *fold change*, significância do resultado a partir da análise estatística por Teste - T e, na última coluna, a via metabólica correspondente aos metabólitos com diferença significativa.

Combinações entre WT e WTLa	t.r	Identificação	Fold Change >2	Test-T (0.1/RAW)	Valor de p	Via metabólica
WT 1h x WTLa 1h	13,333	4-Aminobutyric acid, N,N,O-tri(trimethylsilyl) derivative	0,24453	S	0,001468	Metabolismo de glutamato/succinato
	13,394	-	0,29108	S	0,027071	-
	10,545	Butanedioic acid, 2TMS derivative	0,43302	NS	-	-
WT 48h x WTLa 48h	12,627	D-(-)-Citramalic acid, 3TMS derivative	0,33624	NS	-	-
	10,545	Butanedioic acid, 2TMS derivative	2,9683	NS	-	-
	9,769	Ethanolamine, 3TMS derivative	0,36182	NS	-	-
	17,755	[5780] D-sorbitol [17.898]	2,7561	NS	-	-
WT 72h x WTLa 72h	12,627	D-(-)-Citramalic acid, 3TMS derivative	0,11836	S	0,014747	Metabolismo do citrato
	10,545	Butanedioic acid, 2TMS derivative	4,558	NS	-	-
	9,769	Ethanolamine, 3TMS derivative	0,2688	NS	-	-
	17,755	[5780] D-sorbitol [17.898]	0,29946	NS	-	-
	32,321	9-Hexadecenoic acid, (Z)-, TBDMS derivative	2,0767	NS	-	-
	23,502	1-Monopalmitin, 2TMS derivative	2,014	NS	-	-
	13,007	3,7-dioxa-2,8-disilanonane, 2,2,8,8-tetramethyl-5,5-bis[[trimethylsilyloxy]methyl]-	-	S	0,044393	-

Foram anotados nove metabólitos, porém, considerados apenas dois: 4-ácido aminobutírico (GABA) e ácido citramálico. A **Figura 16** apresenta os espectros derivados da análise por espectrometria de massas de cada um dos metabólitos considerados importantes na separação entre os grupos. Após uma hora de infecção, há o aumento de GABA no grupo infectado. Como discutido no item 5.2, este metabólito é reduzido em macrófagos pró-inflamatórios. Neste caso, é o momento inicial do contato entre a célula e o parasito, ou seja, o momento de maturação dos fagossomos para eliminação do patógeno. Estudos com infecções bacterianas demonstram que a ativação GABAérgica aumenta a resposta antimicrobiana (KIM et al., 2018). Como ao longo do tempo este metabólito não se mostrou alterado, sugere-se que sua ocorrência esteja associada à redução modulada pelo próprio parasito, contribuindo para seu estabelecimento no interior da célula.

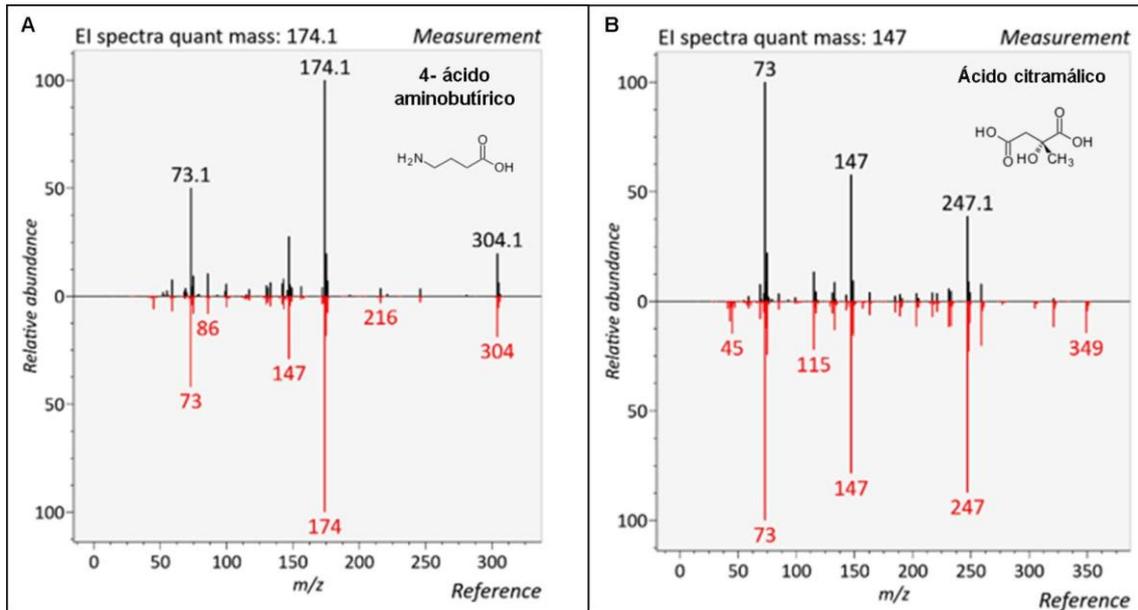


Figura 16: Espectrometria de massas e identificação de metabólitos com diferença estatística significativa entre os grupos WT e WTLA com estrutura química. **A.** 4-ácido aminobutírico. **B.** ácido citramálico.

Interessantemente, o ácido citramálico foi identificado de forma consistente nas amostras de macrófagos KO para FABP4 infectados com *L. amazonensis*, com validação espectrométrica (**Figura 16B**) e significância estatística ($p < 0,05$). Este metabólito, embora não descrito como típico do metabolismo de mamíferos ou do parasito, pode estar associado a vias metabólicas alternativas ativadas em resposta à deficiência de FABP4 e ao estresse metabólico gerado pela infecção. A origem putativa bacteriana foi considerada, mas descartada com base na ausência do composto nos grupos controle e na confirmação espectral. A presença do ácido citramálico, portanto, pode refletir uma reprogramação metabólica não convencional, possivelmente relacionada a alterações no metabolismo do citrato ou adaptação mitocondrial. Este achado abre novas possibilidades para investigação de vias metabólicas latentes em contexto de infecção e disfunção lipídica.

Este metabólito apresentou-se aumentado no grupo infectado após 72h. Estudos indicam que macrófagos ativados possuem um acúmulo citrato, importante para a síntese de ácidos graxos e polarização de macrófagos. Como discutido anteriormente, os resultados de expressão gênica indicam uma possível polarização de macrófagos WT infectados para M1, que também apresentam um acúmulo de citrato, embora modulações deste metabólito também podem estar presente na polarização para M2, mas com maior consumo do mesmo (KELLY e O'NEILL, 2015;

WILLIAMS e O'NEILL, 2018). Dessa forma, seu aumento pode estar colaborando com a tentativa de controle da inflamação e redução da carga parasitária observada na **Figura 6**, mostrando-se não relevante na ausência de FABP4.

Quando avaliados os grupos KO em relação ao KO infectado, foram anotados 12 metabólitos, sendo quatro considerados de maior importância para a separação dos grupos (**Quadro 6**).

Quadro 6: Metabólitos anotados referente a comparação entre macrófagos KO e KOLa nos períodos de 1, 48 e 72h. Na primeira coluna é apresentada a combinação entre as amostras, seguida do tempo de retenção (t.r.), da identificação do metabólito encontrado, *fold change*, significância do resultado a partir da análise estatística por Teste - T e, na última coluna, a via metabólica correspondente aos metabólitos com diferença significativa.

Combinações entre KO e KOLa/	t.r	Identificação	Fold Change >2	Test-T (0.1/RAW)	Valor de p	Via metabólica
KO 1h x KOLa 1h	13,394	-	5,6654	S	0,07081	-
	17,755	[5780] D-sorbitol [17.898]	0,080587	NS	-	-
	13,333	4-Aminobutyric acid, N,N,O-tri(trimethylsilyl) derivative	2,3818	NS	-	-
KO 48h x KOLa 48h	12,627	D-(-)-Citramalic acid, 3TMS derivative	0,18087	S	0,041052	Metabolismo do citrato
	9,769	Ethanolamine, 3TMS derivative	0,2984	S	0,050436	Metabolismo do glicerofosfolípido
	10,545	Butanedioic acid, 2TMS derivative	3,2262	NS	-	-
	17,755	[5780] D-sorbitol [17.898]	3,007	NS	-	-
	18,669	-	0,43889	NS	-	-
	13,333	4-Aminobutyric acid, N,N,O-tri(trimethylsilyl) derivative	0,45143	NS	-	-
	18,43	Oxalic acid, isohexyl pentyl ester	2,107	S	0,039997	Metabolismo de glioxilato e dicarboxilato
KO 72h x KOLa 72h	17,148	-	-	S	0,060511	-
	12,627	D-(-)-Citramalic acid, 3TMS derivative	0,074471	S	0,016238	Metabolismo do citrato
	9,769	Ethanolamine, 3TMS derivative	0,33751	NS	-	-
	19,242	Myo-Inositol, 6TMS derivative	0,37647	NS	-	-
	17,755	[5780] D-sorbitol [17.898]	2,3426	NS	-	-
	13,007	3,7-dioxa-2,8-disilanonane, 2,2,8,8-tetramethyl-5,5-bis[[[(trimethylsilyl)oxy]methyl]-	2,0855	NS	-	-
19,242	Myo-Inositol, 6TMS derivative	0,37647	S	0,042821	Metabolismo do inositol fosfato	

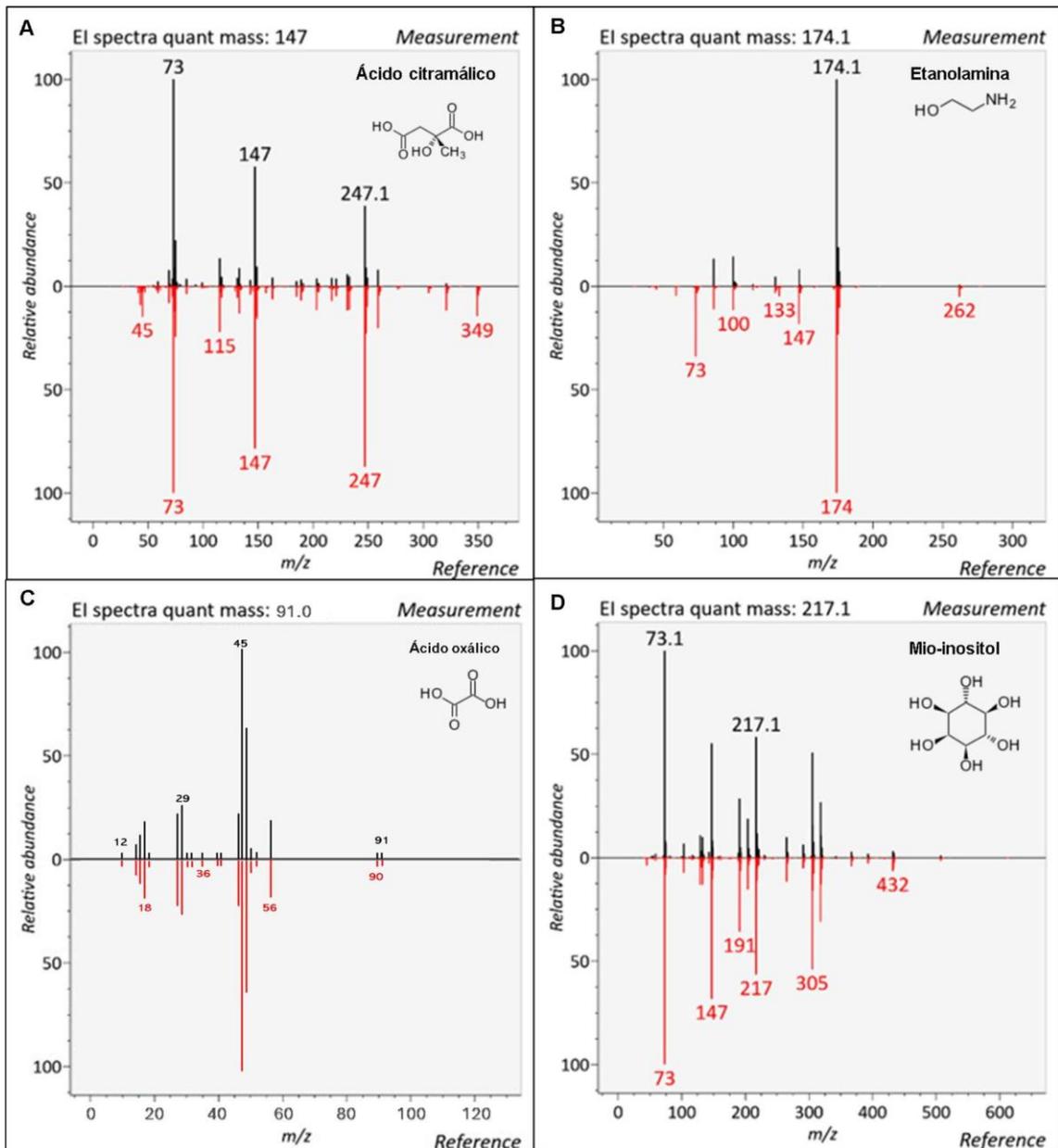


Figura 17: Espectrometria de massas e identificação de metabólitos com diferença estatística significativa entre os grupos KO e KOLa com estrutura química. A. ácido citramálico; **B.** etanolamina; **C.** ácido oxálico e **D.** mio-inositol.

Os metabólitos com diferenças significativas foram: ácido citramálico, etanolamina, ácido oxálico e mio-inositol. Após 48h de infecção, o grupo KO infectado apresentou acúmulo de ácido citramálico, etanolamina e redução de ácido oxálico (**Quadro 6, Figura 17**).

Como discutido anteriormente, o ácido citramálico também atua na síntese de ácidos graxos, algo relevante nestas células sem FABP4. A carga parasitária aumenta ao longo do tempo, embora após 48h ainda seja menor em relação ao grupo WT infectado. Porém, após 72h de infecção, observamos este aumento

também, portanto, neste contexto, pode ser ainda representar a polarização do macrófago para M2, embora não seja possível afirmarmos se ocorre acúmulo ou maior consumo de citrato pela metodologia aplicada.

Já a etanolamina é um componente de fosfolipídeos de membrana importante durante a fagocitose e também durante a polarização para M2, corroborando a hipótese já abordada (RUBIO et al., 2015; GIL-DE-GÓMEZ et al., 2017). Embora os trabalhos com etanolamina sejam com infecções bacterianas, como *Leishmania* também está diretamente envolvida com o processo de fagocitose para sua internalização e permanência em vacúolos, podemos supor que as mesmas vias possam estar envolvidas nas diferentes infecções.

O ácido oxálico, por sua vez, apresentou-se reduzido no grupo infectado. Dado interessante visto que este metabólito pode contribuir para o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e a expressão de citocinas pró-inflamatórias (KUMAR et al., 2021; KUMAR et al., 2023). Dessa forma, com sua redução, o parasito permanece na célula e se multiplica, resultado confirmado pelo aumento da carga parasitária. Na ausência de FABP4, a célula altera seu metabolismo e a modulação favorecendo a sobrevivência do parasito parece ser mais eficiente.

Finalmente, outro metabólito aumentado no grupo infectado após 72h é o mio-inositol. Dados indicam que na incubação de macrófagos com este metabólito, ocorre maior eficiência da fagocitose de bactérias resistentes, contribuindo para sua eliminação. Além disso, é um componente essencial da composição de fosfoinosítídeos, lipídios de membrana importantes para a sinalização celular e associados ao metabolismo lipídico (CHEN et al., 2015; WILL e HAMMOND, 2022). Porém, em *Leishmania*, sabe-se que possui grande importância para sua sobrevivência, tanto que já foi descrita a via de biossíntese *de novo* de mio-inositol e seus transportadores específicos para sua captação (SINHA et al., 2020). Seu aumento no grupo KO infectado pode ser um mecanismo da célula voltado à tentativa de contenção da inflamação, visto que após 72h, a carga parasitária aumenta gradativamente. Por se tratar de uma célula inflamada cronicamente, esse aumento pode representar uma regulação para controle da infecção.

Quadro 7: Metabólitos anotados referentes à comparação entre macrófagos KOLa e WTLa nos períodos de 1, 48 e 72h. Na primeira coluna é apresentada a combinação entre as amostras, seguida do tempo de retenção (t.r.), da identificação do metabólito encontrado, *fold change*, significância do resultado a partir da análise estatística por Teste - T e, na última coluna, a via metabólica correspondente aos metabólitos com diferença significativa.

Combinações entre KOLa e WTLa	t.r	Identificação	Fold Change >2	Test-T (0.1/RAW)	Valor de p	Via metabólica
KOLa 1h X WTLa 1h	17,755	[5780] D-sorbitol [17.898]	12,481	NS	-	-
	13,394	-	0,39105	S	0,034078	-
	18,669	-	2,1677	NS	-	-
	32,321	-	0,46859	NS	-	-
	13,333	4-Aminobutyric acid, N,N,O-tri(trimethylsilyl) derivative	0,48448	S	0,047642	Metabolismo de glutamato/succinato
KOLa 48h X WTLa 48h	17,148	-	0,47419	S	0,077946	-
	17,062	D-(-)-Tagatose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (anti)	0,48965	S	0,066713	Metabolismo da galactose
KOLa 72h X WTLa 72h	10,545	Butanedioic acid, 2TMS derivative	2,2123	NS	-	-

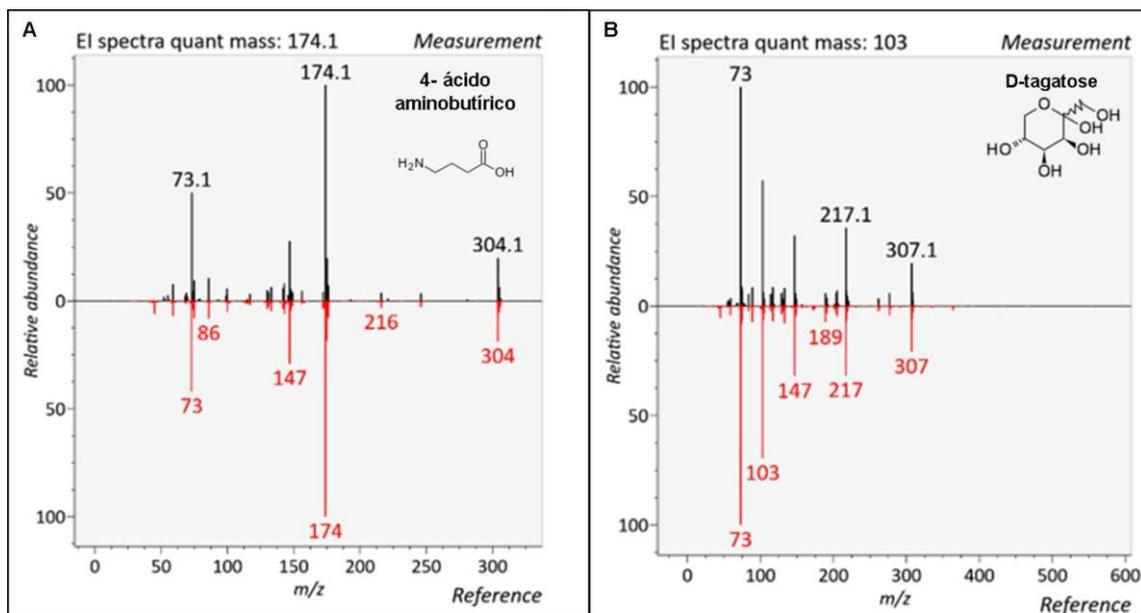


Figura 18: Espectrometria de massas e identificação de metabólitos com diferença estatística significativa entre os grupos KOLa e WTLa com estrutura química. A. 4-ácido aminobutírico, **B.** D-tagatose.

Após as análises comparando os tipos de macrófagos WT e *fabp4*-KO não infectados em relação aos seus respectivos grupos infectados, realizamos a comparação entre os dois grupos, WT e *fabp4*-KO infectados. Foram identificados o GABA e D-tagatose (TAG), mais abundantes após 1 e 48h, respectivamente, ambos no grupo WT infectado em relação ao KO (**Quadro 7**). O aumento de GABA é o

mesmo observado no **Quadro 5**. Já TAG, um isômero de frutose, está presente no metabolismo da galactose. Há poucos estudos específicos que relacionam a TAG com macrófagos, porém sabe-se que o metabolismo da galactose influencia a ativação de macrófagos e a síntese de citocinas inflamatórias, algo que corrobora os dados anteriores referente ao macrófago WT com perfil M1 (LI et al., 2022).

5.3.2 Infecções *in vivo*

Após a caracterização dos macrófagos *fabp4*-KO e selvagens *in vitro*, submetidos ou não à infecção por *L. amazonensis*, foram estabelecidas infecções nos camundongos para avaliação da progressão da lesão, a fim de verificarmos se a ausência de FABP4 no hospedeiro murino teria o potencial de alterá-las. Para isso, foram utilizados dois grupos, um com animais C57/BL6 nocauteados para FABP4 e outro com animais selvagens. Foi realizada a inoculação de 1×10^6 amastigotas de *L. amazonensis* no coxim plantar traseiro esquerdo de cada animal. A progressão da lesão foi avaliada semanalmente pela medida da pata infectada em relação à pata não inoculada. As médias das medidas foram plotadas em planilhas para obtenção de gráficos e, após o período de 9-10 semanas, os animais foram eutanasiados para remoção das patas, baço e fígado. Todos os órgãos foram pesados para comparação e a pata infectada de cada animal foi utilizada para quantificação de parasitos por grama de lesão a partir de diluição limitante. Foram ainda obtidas fotos dos animais antes da eutanásia.

Nas semanas iniciais, as medidas das lesões progrediram de forma relativamente mais acentuada nos animais do grupo WT em comparação aos animais do grupo KO. Contudo, na sexta semana, houve um padrão de inversão da curva de progressão das medidas das lesões, sendo que as lesões do grupo KO apresentaram piora ao longo do tempo até o momento da eutanásia, inclusive com aspecto ulcerado em patas da maior parte dos animais KO. Após o primeiro ensaio (**Figura 19A, D**), outros dois experimentos foram realizados (**Figuras 20A, D, 21A, D**), revelando que a tendência ao mesmo padrão repetiu-se para os três experimentos independentes.

No que se refere ao peso da lesão (pata), baço e fígado, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos três ensaios (**Figuras 19B-**

21B). A investigação do peso de órgãos viscerais partiu da premissa de que as lesões aumentadas e com aspectos mais severos em animais KO, observadas antes da eutanásia, poderiam justificar a disseminação do parasito, conforme verificado anteriormente (dados observados no laboratório; ARRUDA et al., 2009). Contudo, não foi possível observarmos parasitos em órgãos analisados por imprints (dados não mostrados).

A quantidade de parasitos por g/lesão teve seus maiores números para alguns animais do grupo KO nos três ensaios (**Figuras 19C-21C**), porém, as médias não foram significativamente diferentes entre animais WT e KO.

Camundongos C57/BL6 são naturalmente mais resistentes à infecção por *L. amazonensis* em relação aos camundongos BALB/c, por exemplo. Estudos indicam que a progressão das lesões pode ser semelhante entre as duas linhagens nas primeiras semanas, porém, observa-se a interrupção do desenvolvimento das lesões em C57/BL6 (VELASQUEZ et al., 2016). Velasquez e cols. reportaram progressão mais controlada que a obtida em nossos ensaios, fato que pode ser explicado pela forma inoculada no estudo anterior (promastigotas de fase estacionária, ainda que em maior número), além de uma cepa LV79, sabidamente menos virulenta que a cepa PH8, utilizada no presente trabalho (VELASQUEZ et al., 2016; TANO et al., 2022). Além disso, a resposta imune nestes animais é marcada pela ativação de macrófagos M1, pela produção de IFN- γ e superóxido, com menor produção de arginase-1. Dessa forma, a redução na formação de lesões ulceradas também é esperada (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2021). Tal fenótipo é confirmado a partir de diferenças no perfil transcriptômico de macrófagos BMDM das duas linhagens durante a infecção por *L. amazonensis*; enquanto BALB/c regula apenas *il-1b* negativamente, C57/BL6 regula 39 genes, com aumento de 22 deles e redução dos demais. Estes genes modulados estão envolvidos na ativação da resposta imune e ativação de cascatas de sinalização que podem explicar diferenças de suscetibilidade (AOKI et al., 2019).

Portanto, o camundongo analisado é classicamente resistente e com uma resposta mais polarizada para o fenótipo M1; porém, com a deleção de FABP4, os dados de transcritos em macrófagos *in vitro* indicam uma tendência à polarização M2 que se mantém durante a infecção (**Figuras 5, 8, 9 e 10**). Da mesma forma, ao observar a progressão da infecção *in vivo*, há um aumento das lesões e presença de úlceras mais evidentes (**Figuras 19, 20 e 21**, letra D). Logo, os dados anteriores

corroboram com as diferenças observadas entre os grupos de camundongos infectados. Mesmo assim, o peso de fígado e baço não altera entre os animais (Figuras 19, 20 e 21, letra B), mas a quantidade de parasitos por grama de lesão apresenta-se maior no grupo KO, apesar de não ser estatisticamente significativo (Figuras 19, 20 e 21, letra C).

Portanto, ao deletar FABP4, uma proteína transportadora de ácidos graxos, observamos uma alteração da resposta imunológica e células cronicamente inflamadas. Trata-se de uma proteína crucial para essa regulação.

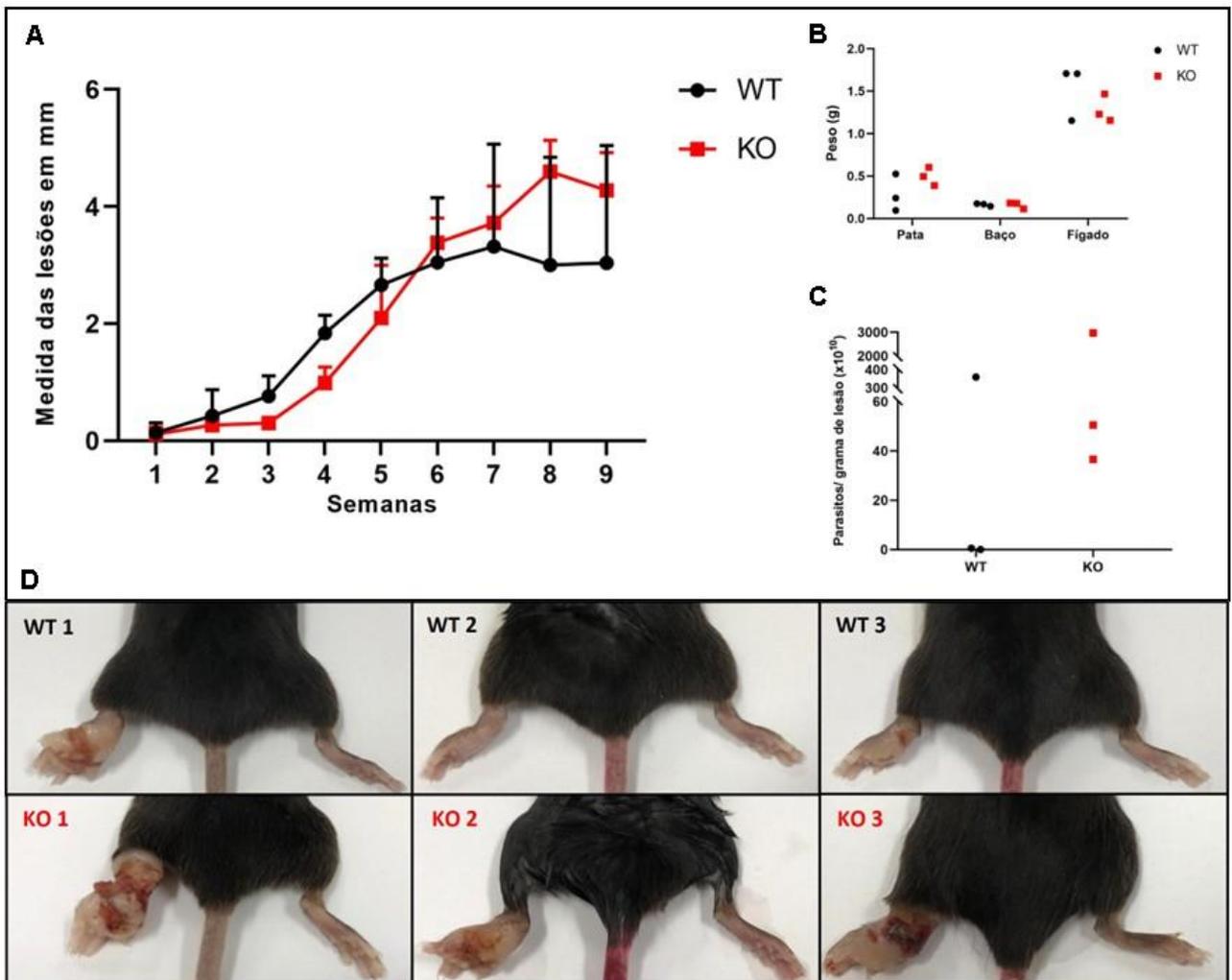


Figura 19: Experimento 1 da infecção *in vivo*. Dois grupos, WT e KO, com 3 animais cada foram separados e infectados com 1×10^6 amastigotas de *L. amazonensis* no coxim plantar traseiro esquerdo. Ao longo das semanas, foram realizadas medidas das patas traseiras. Os valores da pata esquerda infectada foram subtraídos dos valores da pata direita, não infectada. Os dados foram obtidos ao longo de 9 semanas, após este período, os animais foram eutanasiados e baço e fígado foram retirados e pesados, assim como as patas. As patas também foram utilizadas para quantificação de parasitos por grama de lesão. **A.** Medida das lesões ao longo das semanas. **B.** Peso dos órgãos. **C.** Carga parasitária na lesão (parasitos por grama de lesão). **D.** Imagens das patas dos camundongos com a respectiva identificação após 9 semanas de infecção. Em preto, dados referentes ao grupo WT, em vermelho, ao grupo KO.

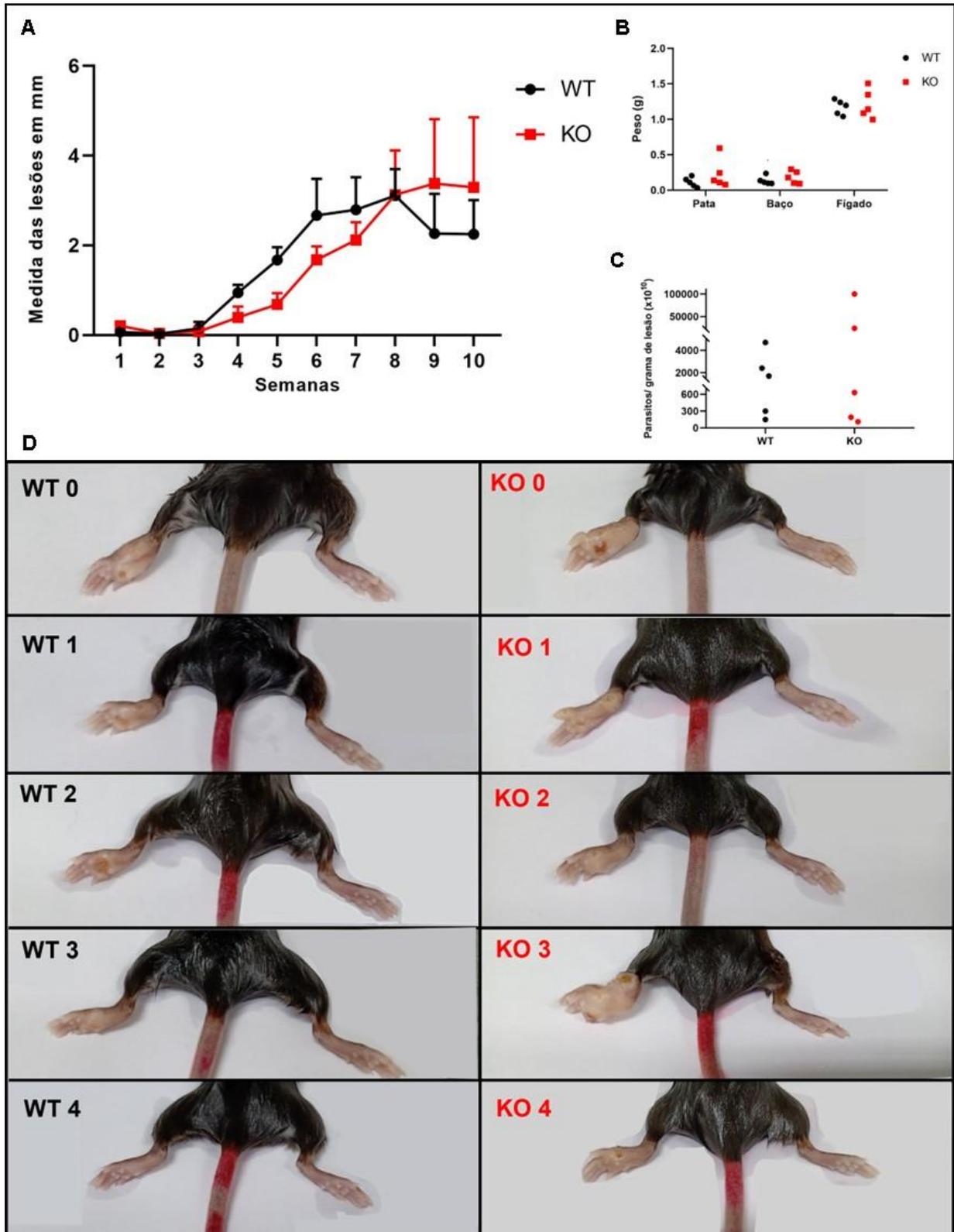


Figura 20: Experimento 2 da infecção *in vivo*. Dois grupos, WT e KO, com 5 animais cada, foram separados e infectados e avaliados conforme descrito na Figura 19. **A.** Medida das lesões ao longo das semanas. **B.** Peso dos órgãos. **C.** Carga parasitária na lesão (parasitos por grama de lesão). **D.** Imagens das patas dos camundongos com a respectiva identificação após 10 semanas de infecção. Em preto, dados referentes ao grupo WT, em vermelho, ao grupo KO.

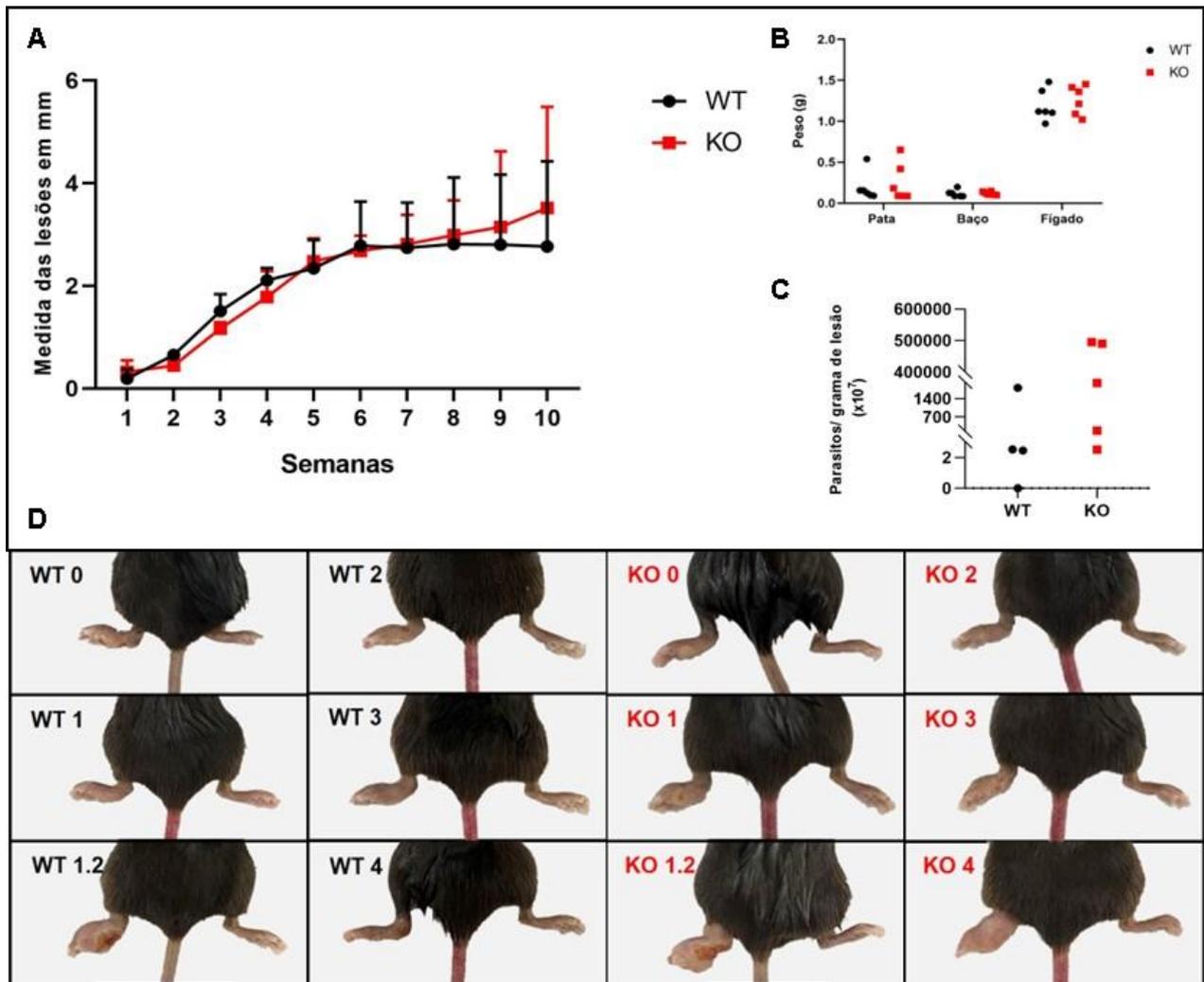


Figura 21: Experimento 3 da infecção *in vivo*. Dois grupos, WT e KO, com 6 animais cada, foram separados e infectados e avaliados conforme descrito na Figura 19. **A.** Medida das lesões ao longo das semanas. **B.** Peso dos órgãos. **C.** Carga parasitária na lesão (parasitos por grama de lesão). **D.** Imagens das patas dos camundongos com a respectiva identificação após 10 semanas de infecção. Em preto, dados referentes ao grupo WT, em vermelho, ao grupo KO.

5.3.2.1 Quantificação de colesterol

Um questionamento feito durante as análises *in vivo* referiu-se à possíveis alterações de níveis séricos de colesterol e triglicerídeos (TG), uma vez que dados bem estabelecidos na literatura apontam que camundongos FABP4-KO apresentam níveis séricos de insulina, TG, colesterol e glicose significativamente reduzidos, em comparação com os animais controle, fato que coloca a FABP4 como relevante alvo para estudos de novas abordagens no controle de diabetes e aterosclerose (FURUHASHI e HOTAMISLIGIL, 2008; YANG et al., 2015; SHU et al., 2017).

Para isso, foram coletados 200µL de sangue do plexo axilar dos camundongos para obtenção do soro. As amostras foram agrupadas em *pools* do soro de acordo com os grupos de animais WT e *fabp4*-KO infectados e não infectados para quantificação de colesterol e TG em colaboração com o grupo da Dra. Helena Barbosa (IB - UNICAMP).

Com base nos resultados obtidos e mostrados na **Figura 22**, podemos concluir que a ausência de FABP4 em macrófagos influencia de forma dinâmica os níveis plasmáticos de colesterol durante a infecção por *Leishmania amazonensis*. Em condições basais (não infectadas), os camundongos *fabp4*-KO apresentam níveis reduzidos de colesterol, em concordância com a literatura que associa a ausência dessa proteína a menor acúmulo lipídico e maior efluxo de colesterol mediado por transportadores como ABCA1 (YANG et al., 2015). Contudo, após 10 semanas de infecção, os animais *fabp4*-KO exibiram aumento significativo no colesterol plasmático, o que não foi observado nos grupos WT. Essa elevação pode refletir uma adaptação do hospedeiro à demanda imposta pelo parasita, já que *L. amazonensis* depende da captação de colesterol do hospedeiro para expansão do vacúolo parasitóforo e replicação intracelular (ANDRADE-NETO et al., 2011; SEGUIN & DESCOTEAUX, 2020; OKUDA et al., 2022). Adicionalmente, a menor inflamação sistêmica associada à deficiência de FABP4 (XU et al., 2022) pode alterar o metabolismo lipídico e favorecer uma redistribuição do colesterol para o compartimento extracelular, como parte da resposta à infecção. Assim, mesmo que o efluxo de colesterol esteja aumentado nos macrófagos *fabp4*-KO, o acúmulo plasmático pode representar um efeito indireto da infecção e da manipulação do ambiente lipídico pelo parasita.

Em relação aos TG, não houve diferença entre os grupos WT infectado e não infectado, porém o grupo *fabp4*-KO infectado apresentou níveis reduzidos quando comparados com o grupo *fabp4*-KO não infectado (**Figura 22**, B). Dessa forma, o metabolismo envolvendo estes lipídios foi diretamente afetado pela ausência de FABP4 e pela infecção. Fernandes e colaboradores avaliaram a infecção de camundongos C57/BL6 suscetíveis a aterosclerose com *L. major*. Os resultados mostraram que esses animais apresentaram aumento dos níveis de colesterol, redução de TG e aumento da aterogênese (FERNANDES et al., 2013). No caso dos camundongos *fabp4*-KO, a ausência da proteína tem uma ação protetora destes animais contra a aterosclerose, porém, na presença de *L. amazonensis*, os níveis de

TG também reduzem. Como estes animais apresentam uma resposta direcionada predominantemente ao perfil Th2 e uma inflamação crônica causada pela alteração do metabolismo lipídico, a redução de TG circulante pode ser uma modulação do organismo frente uma tendência à inflamação exacerbada durante a infecção (GARIN-SHKOLNIK et al., 2014).

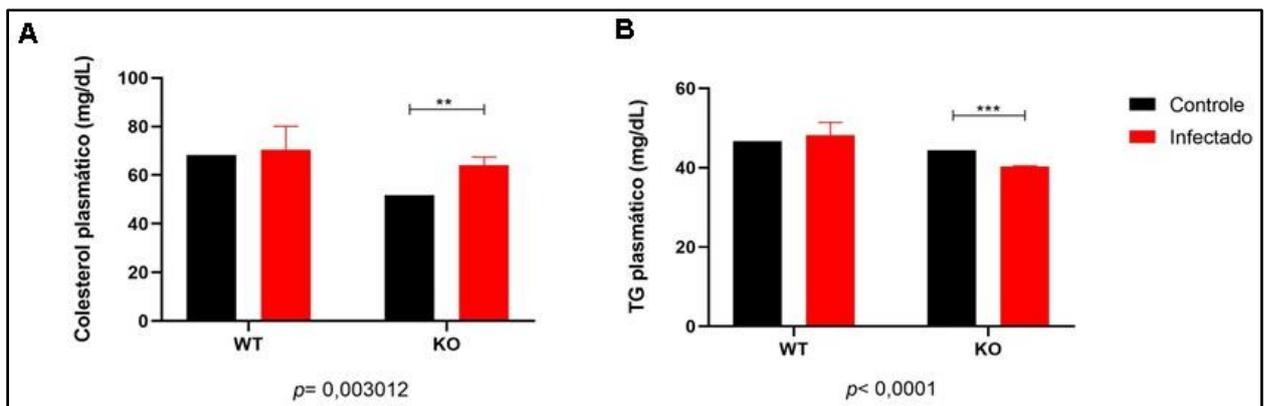


Figura 22: Quantificação de colesterol e triglicérides (TG) a partir de plasma de camundongos WT e *fabp4*-KO (KO) infectados ou não com *L. amazonensis*. Foram coletados 200 μ L de sangue do plexo axilar de camundongos WT e *fabp4*-KO infectados ou não com *L. amazonensis*. Do soro obtido, foi realizada a quantificação de colesterol e TG a partir de teste enzimático colorimétrico (Bioclin Química Básica Ltda. cat No. #K083 e #K117). **A.** Colesterol plasmático em mg/dL; **B.** TG plasmático em mg/dL. Em preto, dados de amostras não infectadas e, em vermelho, de amostras infectadas. ** $p = 0,003012$ e *** $p < 0,0001$ (teste- T).

Esses achados ressaltam a relevância funcional da FABP4 no controle do metabolismo lipídico em contextos infecciosos e sugerem que, embora sua ausência tenha efeitos benéficos anti-inflamatórios, pode também influenciar a disponibilidade de lipídios essenciais ao parasita, impactando a progressão da leishmaniose.

5.3.2.2 Expressão gênica no sítio da lesão murina

As patas dos animais foram também utilizadas para extração de RNA e síntese de cDNA para análise da expressão gênica no sítio da lesão. Inicialmente, avaliou-se o extratos do homogeneizado das patas traseiras de animais WT e *fabp4*-KO não infectados. As análises foram realizadas da mesma forma descrita

anteriormente. Neste caso, a expressão foi quantificada em relação à média da expressão de cada gene das amostras do grupo WT ao final do experimento.

Na **Figura 23**, observa-se o aumento significativo de *cd36*, *fabp5*, *lxr* e *nf-kb* no grupo *fabp4*-KO, mas também há uma tendência ao aumento de *abca1*, *c-fos* e *ppar-γ*. Dentre as alterações já descritas em animais *fabp4*-KO, estão a redução da inflamação e do estresse oxidativo. Além disso, estes animais apresentam um aumento da captação de LDL por macrófagos. O excesso dessas lipoproteínas são convertidas em ésteres de colesterol cujo efluxo também é aumentado, o que explica o padrão observado (HOTAMISLIGIL et al., 1996; FURUHASHI et al., 2007; SO et al., 2023).

Todas essas características auxiliam na compreensão das alterações nas expressões de *cd36* e *abca1*. Outra característica é a possível compensação por FABP5, que pode explicar o aumento da expressão de *fabp5*. Como discutido no item 5.2 (**Figura 5**), neste caso também há o aumento de *lxr-α* cuja proteína é ativada por PPAR-γ e, como consequência, capaz de induzir ABCA1. Já em relação a indicadores pró ou anti-inflamatórios, há aumento da expressão de *nf-kb* e tendência à redução de *il-4* e *inos*, uma característica de perfil anti-inflamatório.

As diferenças observadas entre nossos resultados *in vitro* e *in vivo* não são inesperadas, pois a literatura documenta diversas situações em que as respostas imunológicas e metabólicas à infecção por *Leishmania* divergem entre esses dois contextos experimentais (BRIOSCHI et al., 2022). Isso se deve, em grande parte, a fatores como o ambiente artificialmente simplificado dos ensaios *in vitro*, a ausência de sinais fisiológicos complexos, variações no metabolismo celular, alterações na regulação gênica, mudanças dependentes do tempo e à influência direta das condições de cultivo. Reconhecer essas limitações é fundamental para interpretar adequadamente os dados obtidos *in vitro* e para sua correta transposição a sistemas biológicos mais complexos e fisiologicamente relevantes.

Senga e colaboradores descrevem que FABP5 estimula a lipólise e a síntese de ácidos graxos e, desta forma, ocorre o aumento dos níveis intracelulares de lipídios e a ativação de NF-kB. Esta ativação pode promover a produção de citocinas inflamatórias (SENGA et al., 2018).

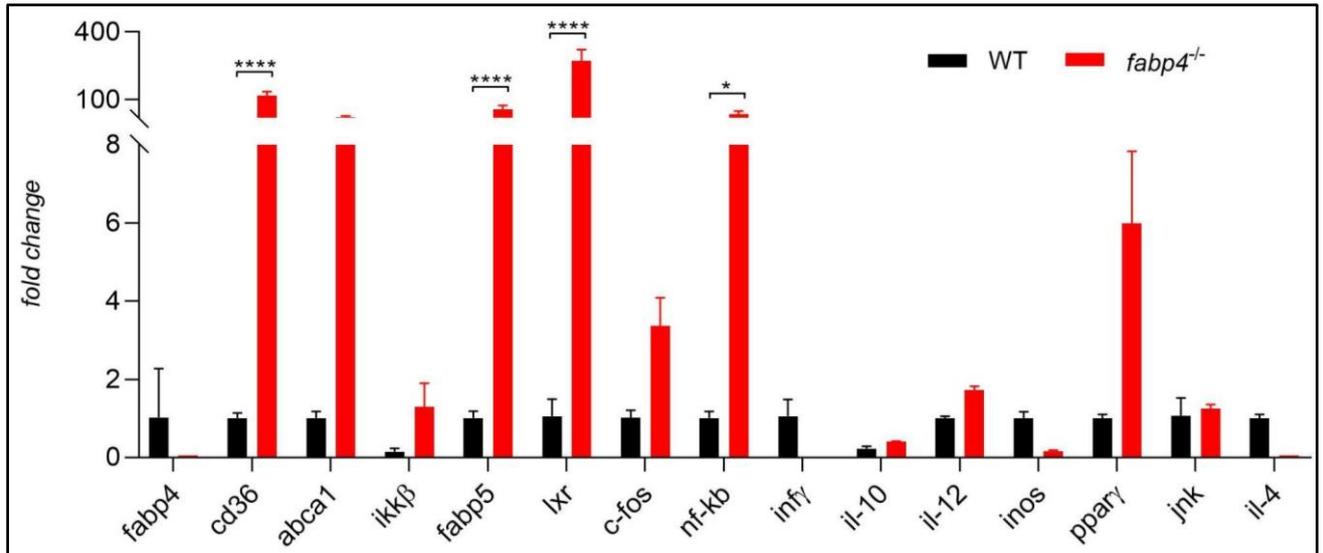


Figura 23: Expressão dos genes em camundongos WT e *fabp4*-KO após 10 semanas. Patas traseiras de camundongos não infectados foram utilizadas para extração de RNA e síntese de cDNA. Foi analisada a expressão de *fabp4*, *cd36*, *abca1*, *ikkβ*, *fabp5*, *lxr-α*, *c-fis*, *nf-kb*, *inf-γ*, *il-10*, *il-12*, *inos*, *ppar-γ*, *jnk* e *il-4* em relação ao gene endógeno *hprt1*. A barra preta representa a expressão em camundongos WT, a vermelha, camundongos *fabp4*-KO. Os resultados correspondem à média ± DP de triplicata biológicas. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ (teste Two-way ANOVA, Dunnett's multiple). Nas comparações para as quais não há asteriscos, a diferença não foi significativa.

Após 10 semanas de infecção, as patas infectadas dos dois grupos (WT e *fabp4*-KO) foram avaliadas quanto à expressão dos genes em relação ao grupo WT não infectado (linha pontilhada, **Figura 24**). O grupo WT infectado apresentou aumento de expressão de *fabp4* e, apesar de não significativo estatisticamente, de *fabp5*, *lxr*, *infy*, *il-12*, *inos*, *ppar-γ* e *il-4*. Ao analisarmos os estudos envolvendo a infecção de camundongos C57/BL6 com *L. amazonensis*, é bem estabelecido que estes animais apresentam perfil de resistência contra essa infecção, mas na ausência de IL-4 e IL-10, pode desenvolver lesões crônicas em virtude da regulação negativa da resposta Th1 (JONES et al., 2002). Dessa forma, os dados de expressão gênica corroboram esta resistência, algo que é observado ainda nas **Figuras 19 a 21D**.

Já o grupo *fabp4*-KO infectado apresentou aumento significativo de *il-4* e uma tendência ao aumento de *cd36*, *abca1*, *lxr-α* e *jnk* quando comparados com o grupo WT infectado (**Figura 24**). De fato, a ausência de FABP4 gera uma desregulação da via envolvida na entrada e efluxo de colesterol, justamente transcritos que, neste caso, mostraram-se aumentados. Contudo, além disso, sua ausência também altera a resposta imune e, como discutido anteriormente, há uma tendência direcionada à

resposta Th2, anti-inflamatória. Este fato justifica o aumento de *il-4* e uma tendência a redução de *inos*. Dessa forma, os dados *in vivo* também apontam para uma alteração da resposta imune que, em camundongos WT apresentam perfil de resistência, mas quando FABP4 encontra-se ausente, é promovida uma alteração para respostas com perfis mais anti-inflamatórios, favoráveis à sobrevivência e multiplicação dos parasitos (**Figuras 19 a 21D**).

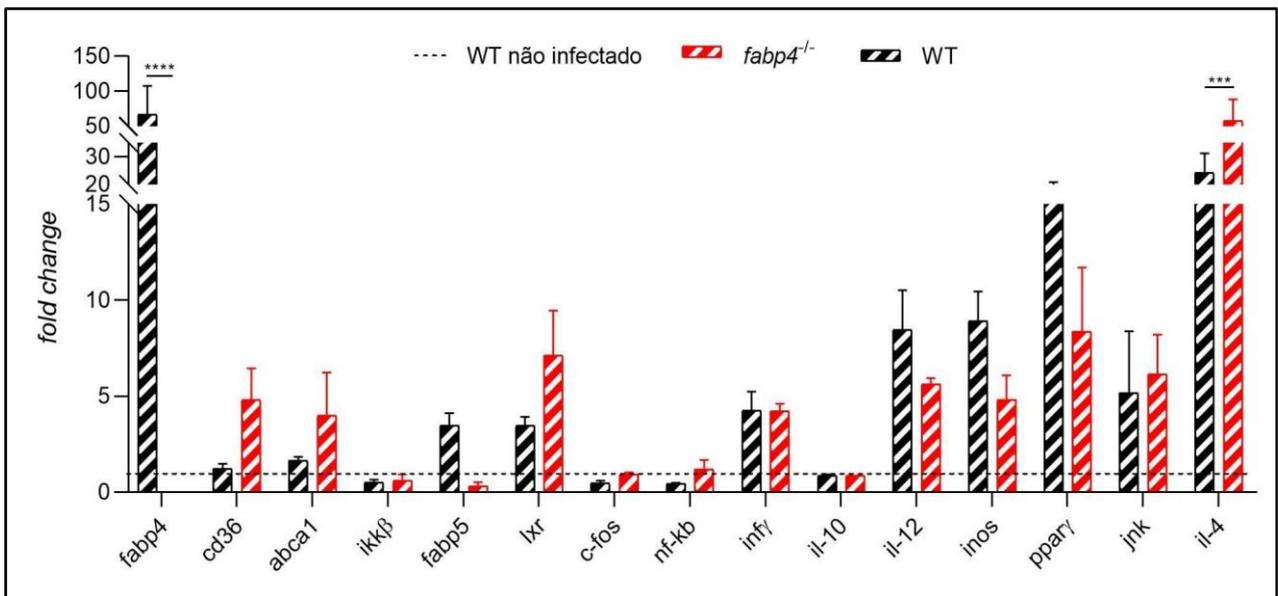


Figura 24: Expressão dos genes em camundongos WT e *fabp4*-KO infectados após 10 semanas com *L. amazonensis*. Patas traseiras de camundongos infectados foram utilizadas para análise de acordo com a descrição da Figura 23. A barra preta listrada representa a expressão em camundongos WT infectados, a vermelha, camundongos *fabp4*-KO infectados e a linha pontilhada, camundongos WT não infectados. Os resultados correspondem à média \pm DP de triplicata biológicas. *** $p < 0,0005$ e **** $p < 0,0001$ (teste Two-way ANOVA, Dunnett's multiple). Nas comparações para as quais não há asteriscos, a diferença não foi significativa.

Vale ressaltar ainda que a progressão das lesões é diferente no início da infecção. Portanto, foram eutanasiados animais após 2 semanas de infecção em que o grupo WT infectado apresentava lesões maiores que aquelas do grupo *fabp4*-KO. As patas foram processadas para extração de RNA para análise da expressão dos genes: *fabp4*, *fabp5*, *ppar-γ*, *lxr-α*, *cd36* e *abca1* (**Figura 25**). De fato, as expressões mostram-se inversas ao observado na **Figura 24**. O grupo *fabp4*-KO apresentou aumento da expressão de *fabp5*, *ppar-γ* e *lxr-α*, indicando maior modulação no sentido ao efluxo de colesterol, apesar dos níveis de *abca1* estarem inalterados,

uma hipótese a ser aventada é a de que a presença do parasito possa influenciar no acúmulo de colesterol para o início da infecção.

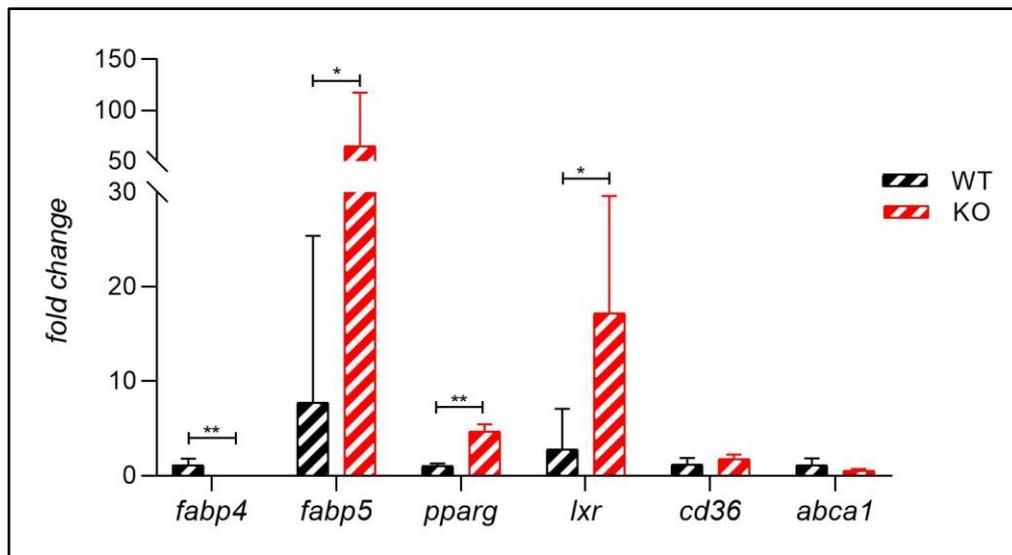


Figura 25: Expressão dos genes em camundongos WT e *fabp4*-KO infectados após 2 semanas com *L. amazonensis*. Patas traseiras de camundongos infectados foram utilizadas para análise de acordo com a descrição da Figura 23. A barra preta listrada representa a expressão em camundongos WT infectados, a vermelha listrada, camundongos *fabp4*-KO infectados. Os resultados correspondem à média \pm DP de triplicata biológicas. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ (teste Two-way ANOVA, Dunnett's multiple). Nas comparações para as quais não há asteriscos, a diferença não foi significativa.

5.4 *Leishmania braziliensis*

Após realizarmos as análises dos grupos WT e *fabp4*-KO não infectados e infectados com *L. amazonensis*, avaliamos a expressão dos genes *cd36*, *fabp4*, *fabp5*, *ppar- γ* , *lxr- α* , *abca1*, *jnk*, *ikk β* , *c-fos*, *nf-kb*, *inos* e *il-10* após 1, 48 e 72h de infecção dos mesmos grupos com *L. braziliensis*.

As duas espécies estudadas são de extrema importância epidemiológica no Brasil, sendo as principais responsáveis por casos de LC, ainda que apresentem diferenças quanto à resposta imune induzida, progressão da doença e formas clínicas mais raras além da LC. Diferentemente de *L. amazonensis*, a infecção por *L. braziliensis* desencadeia resposta inflamatória intensa com a presença de menos parasitos. Além disso, a formação do vacúolo parasitóforo também difere; enquanto *L. amazonensis* forma vacúolos grandes com muitos parasitos, *L. braziliensis* permanece em vacúolos pequenos e individuais (PEREIRA et al., 2017; MENDES et al., 2022; DE OLIVEIRA et al., 2025). Como todas estas diferenças podem envolver

a via analisada na presente tese, tornou-se importante avaliar a expressão gênica em infecções *in vitro*.

Para isso, a infecção foi realizada com amastigotas axênicos de *L. braziliensis* na proporção de 5 parasitos por macrófago por 1, 48 e 72h. Após os períodos, as células foram contadas e o resultado foi plotado nos gráficos de taxa de infecção e número de amastigotas a cada 100 macrófagos infectados (**Figura 26**). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos WT e *fabp4*-KO infectados, mas ao longo dos tempos, ambos os grupos mostraram redução da taxa de infecção (**Figura 26A**). Da mesma forma, não houve diferenças entre o número de parasitos a cada 100 macrófagos infectados, porém, como mostrado na **Figura 26B**, observa-se que os valores mantiveram-se em constância, indicando a presença de poucos parasitos por célula, mas com tendência discreta de aumento da carga intracelular no grupo nocaute após 72h.

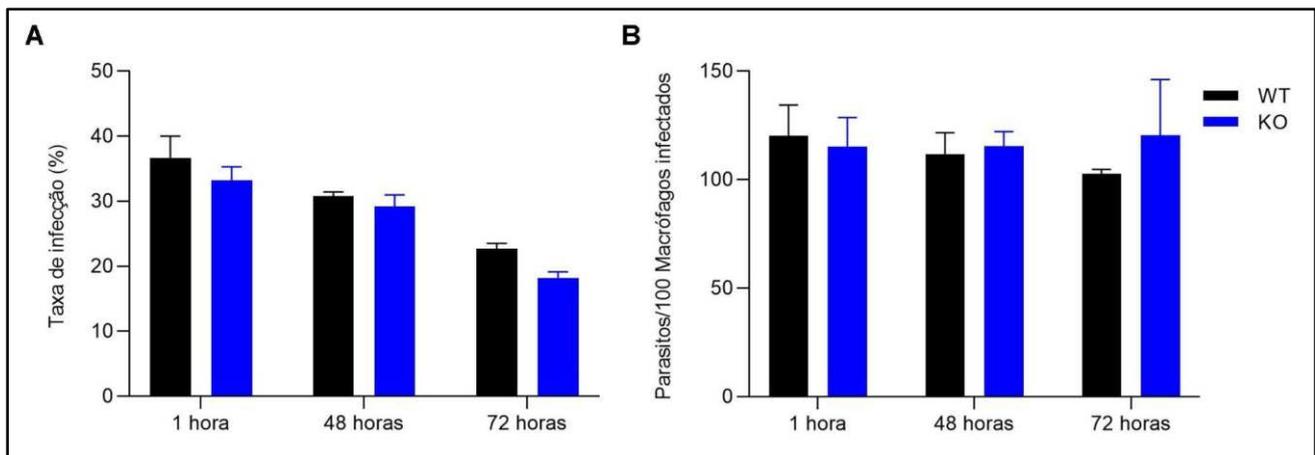
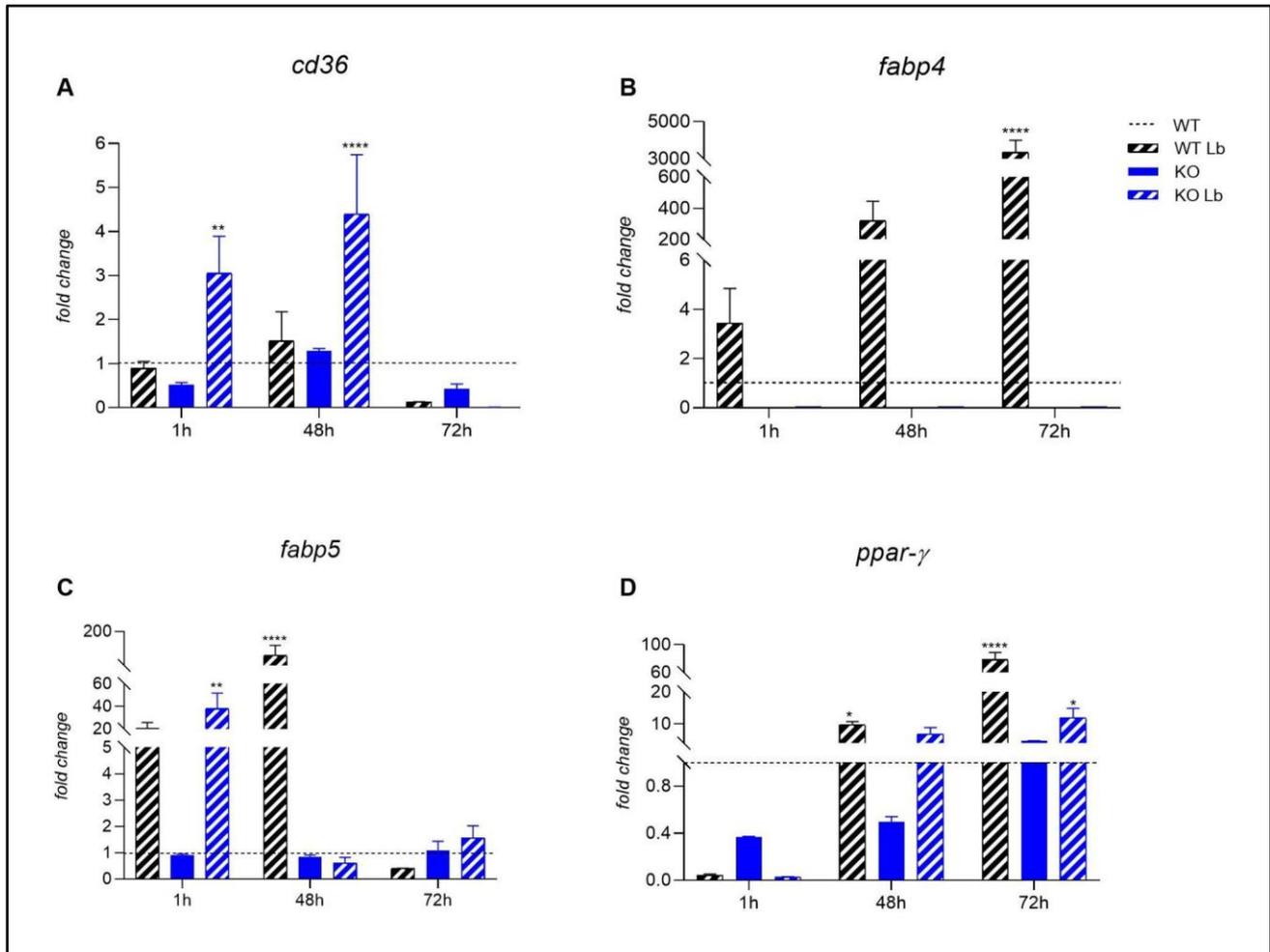


Figura 26: Infecção de macrófagos com *L. braziliensis*. Macrófagos diferenciados foram obtidos de camundongos C57/BL6 WT (barras pretas) e *fabp4*-KO (KO: barras azuis) e infectados com amastigotas axênicos de *L. braziliensis* (MOI = 5) por 1, 48 e 72h. **A.** Taxa de infecção representada pela porcentagem de macrófagos infectados e **B.** Número de parasitos a cada 100 macrófagos infectados. Os valores foram obtidos por contagem em microscópio óptico de triplicatas de infecção em lamínulas fixadas e coradas com kit Instant Prov.

5.4.1 Expressão gênica

A metodologia utilizada para obtenção dos dados de expressão foi a mesma descrita no item 5.3.1.1. Na **Figura 27** é possível observar que o grupo *fabp4*-KO infectado apresentou aumento da expressão de *cd36* após 1 e 48h de infecção. Os

outros grupos mantiveram expressão basal, embora após 72h, os grupos WT e *fabp4*-KO infectados tenham apresentado redução, apesar de não significativa, assim como o grupo *fabp4*-KO não infectado. Dessa forma, é plausível que a presença de FABP4 possa modular a expressão de *cd36* ao longo da infecção, dado o aumento durante a infecção na ausência de FABP4.



Em relação à *fabp4* (Figura 27B), seu aumento é significativo ao longo dos tempos de infecção no grupo WT infectado. *L. braziliensis* induz esse aumento de expressão, mas, como abordado anteriormente, FABP4 tem um papel importante no

metabolismo lipídico e estudos indicam que *L. braziliensis* modula a expressão de genes envolvidos nesta via através da supressão da biossíntese de colesterol (OVALLE-BRACHO et al., 2015). Os dados obtidos na análise dos genes não são conclusivos quanto à ativação desta via ser uma resposta da célula contra o parasito ou uma modulação de *L. braziliensis* para obtenção de ácidos graxos, até porque a taxa de infecção reduz ao longo do tempo.

Já FABP5, como discutido antes, foi avaliada para se observar uma possível compensação na ausência de FABP4. Na **Figura 27C**, nota-se o aumento após 1h de infecção nos grupos WT e *fabp4*-KO infectados. Porém, após 48h, apenas o grupo WT infectado apresenta incremento de transcritos, os demais grupos reestabelecem a expressão basal, que se mantém após 72h também com a normalização da expressão do grupo WT infectado. Dessa forma, esse gene aparenta ser regulado pela *L. braziliensis* na primeira hora de infecção, talvez em busca de uma compensação da ausência de *fabp4*, mas também necessária quando *fabp4* está presente nas primeiras horas de infecção. Portanto, da mesma forma observada em *L. amazonensis*, no grupo WT infectado, FABP5 pode estar relacionada à resposta inflamatórias de macrófagos (GUO et al., 2021; HOU et al., 2022).

A expressão de *ppar-γ*, por sua vez, aumenta nos grupos WT e *fabp4*-KO infectados após 48 e 72h (**Figura 27D**). Porém, o aumento é mais significativo no grupo WT infectado. Logo, essa expressão aparenta ser induzida por *L. braziliensis*, mas com uma potencialização por FABP4, visto que esta proteína ativa PPAR-γ em macrófagos. Neste caso, ocorre uma resposta eficiente contra o parasito, logo esta proteína pode estar relacionada a essa resposta em conjunto com FABP5 e FABP4.

Na **Figura 28**, observa-se a expressão de *lxr-α*, *abca1*, *inos* e *il-10*. A expressão de *lxr-α* está aumentada nos grupos WT e *fabp4*-KO infectados após 1 e 48h. Após 72h, apenas o grupo WT infectado apresenta maior expressão (**Figura 28A**). Independente de FABP4, *lxr-α* é induzido por *L. braziliensis* e é sabido que LXR ativa ABCA1, como discutido anteriormente. O parasito estimula a via de efluxo de colesterol, contudo, com potencialização na presença de FABP4. Mas a proteína LXR-α é importante para o efeito anti-inflamatório como discutido na infecção por *L. amazonensis*, mas neste caso tal resposta não é eficiente, visto que a taxa de infecção reduz ao longo dos tempos de infecção (BRUHN et al., 2010).

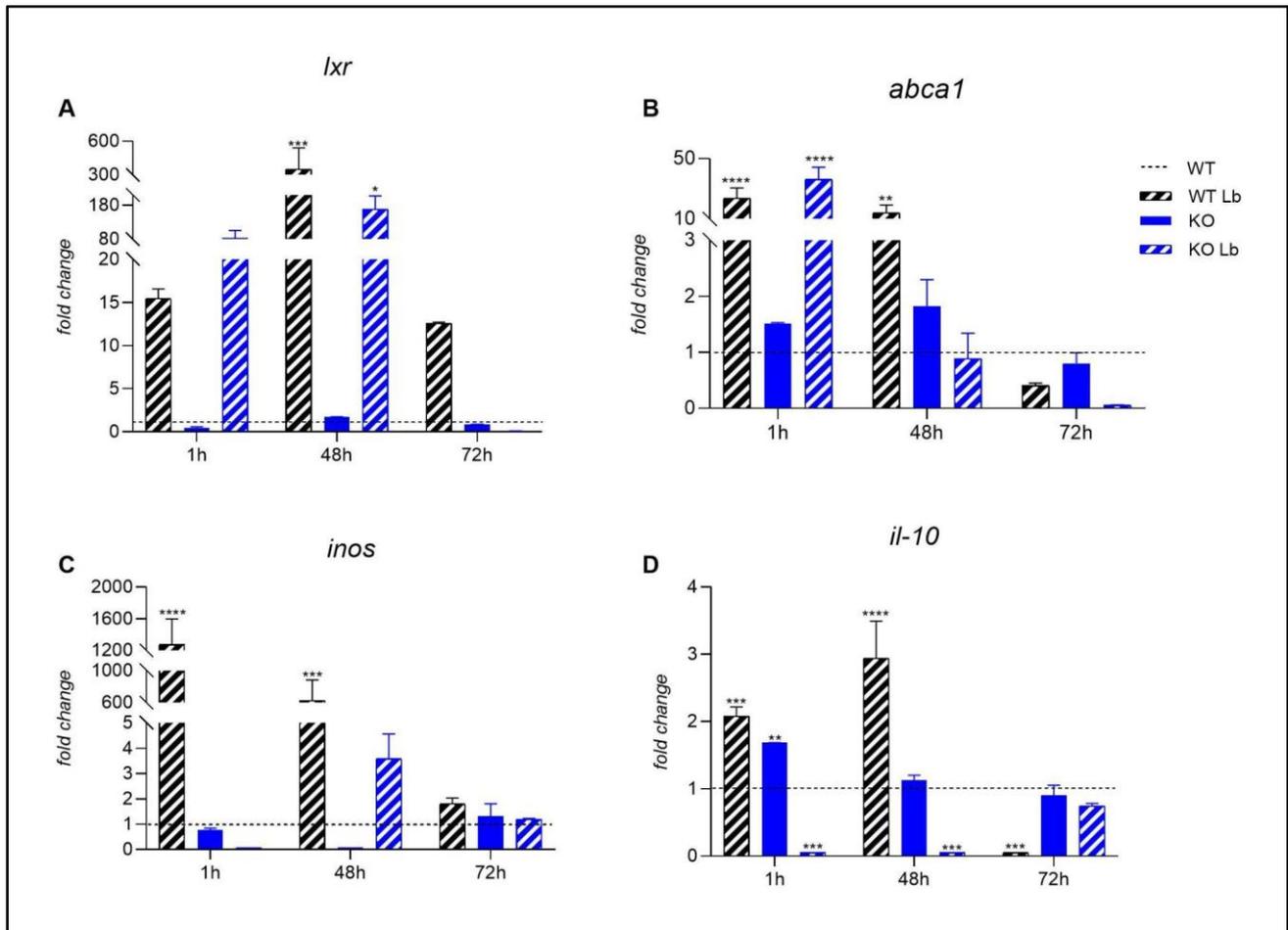


Figura 28: Gráficos de expressão de *lxr*- α (A), *abca1* (B), *inos* (C) e *il-10* (D) em macrófagos WT e KO infectados ou não com amastigotas de *L. braziliensis*. Macrófagos cultivados nas mesmas condições descritas na legenda da Figura 27. A linha pontilhada representa a expressão de macrófagos WT não infectados. A barra preta listrada representa a expressão de macrófagos WT infectados, a azul, macrófagos KO não infectados e a azul listrada, macrófagos KO infectados. Os resultados correspondem à média \pm DP de triplicata biológicas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; * $p < 0,0005$ e **** $p < 0,0001$ (teste Two-way ANOVA, Dunnett's multiple). Nas comparações para as quais não há asteriscos, a diferença não foi significativa.**

Já a expressão de *abca1* está aumentada nos grupos WT e *fabp4*-KO infectados após 1h e no grupo WT infectado após 48h (**Figura 28B**). Essa expressão acompanha a observada com *lxr*- α . Assim como observado em *L. amazonensis*, *L. braziliensis* também parece estimular o metabolismo lipídico no início da infecção. Mas, essas proteínas também influenciam na resposta anti-inflamatória. Silva e colaboradores demonstraram que a infecção por *L. braziliensis* promove a polarização de macrófagos BMDM de camundongos BALB/c para o fenótipo M2 (FLORO e SILVA et al., 2025). No caso dos dados da **Figura 28**, a

infecção por *L. braziliensis* em um modelo que tende ao fenótipo M2 como o macrófago *fabp4*-KO não foi bem-sucedida.

Uma explicação para esse insucesso é a expressão aumentada de *inos* no grupo WT infectado após 1 e 48h, assim como a expressão de *il-10* (**Figura 28 C e D**). O grupo *fabp4*-KO infectado apresenta aumento de *inos* apenas após 48h de infecção e redução nos outros tempos avaliados assim como na expressão de *il-10* nos três tempos avaliados. Teixeira e colaboradores demonstraram que mesmo na ausência de NO, as infecções de macrófagos murinos por *L. braziliensis* é controlada (TEIXEIRA et al., 2022). Já *il-10* aumentada no grupo WT infectado pode ser indicativa de uma resposta aos lipídios do parasito. Estudos mostram que essas moléculas influenciam na ativação dos macrófagos e na expressão de *il-10* (CARFAGNA et al., 2020). Porém, após 72h de infecção, os níveis retornam à expressão basal, indicando um controle da célula hospedeira diante desta infecção. Algo interessante é que na ausência de FABP4, o controle da infecção persiste, entretanto, as modulações gênicas neste caso não são bem compreendidas.

Por fim, a **Figura 29** apresenta as expressões de *jnk*, *ikk β* , *c-fos* e *nf-kb*. Tais genes codificam proteínas envolvidas na resposta imune do hospedeiro como explicitado previamente. O gene *jnk* apresenta expressão aumentada nos grupos WT e *fabp4*-KO após todos os tempos avaliados de infecção (**Figura 29A**). Dessa forma, pode-se supor que sua expressão esteja relacionada à presença de *L. braziliensis*. Sabe-se que na presença desta espécie e infecções, há ativação de NF-kB e JNK, o que confirma o aumento esperado. Na **Figura 29D** também se observa incremento apenas nos grupos WT e *fabp4*-KO infectados, ainda que apenas após 1 e 48h de infecção (IBRAIM et al., 2013).

Já *ikk β* apresenta aumento significativo na expressão apenas no grupo WT infectado após 48h (**Figura 29B**). No caso de *c-fos*, observam-se mais transcritos no grupo *fabp4*-KO infectado após 1h e redução nos demais tempos, enquanto que para o grupo WT infectado, a abundância de transcritos é verificada para 48h (**Figura 29C**). IKK β está envolvida na ativação da via NF-kB e resposta inflamatória, embora os dados indiquem que essa ativação depende da presença de FABP4. Já *c-fos* aparenta incremento de transcritos como resposta inicial, apenas, para o grupo *fabp4*-KO infectado e tardia no grupo WT infectado.

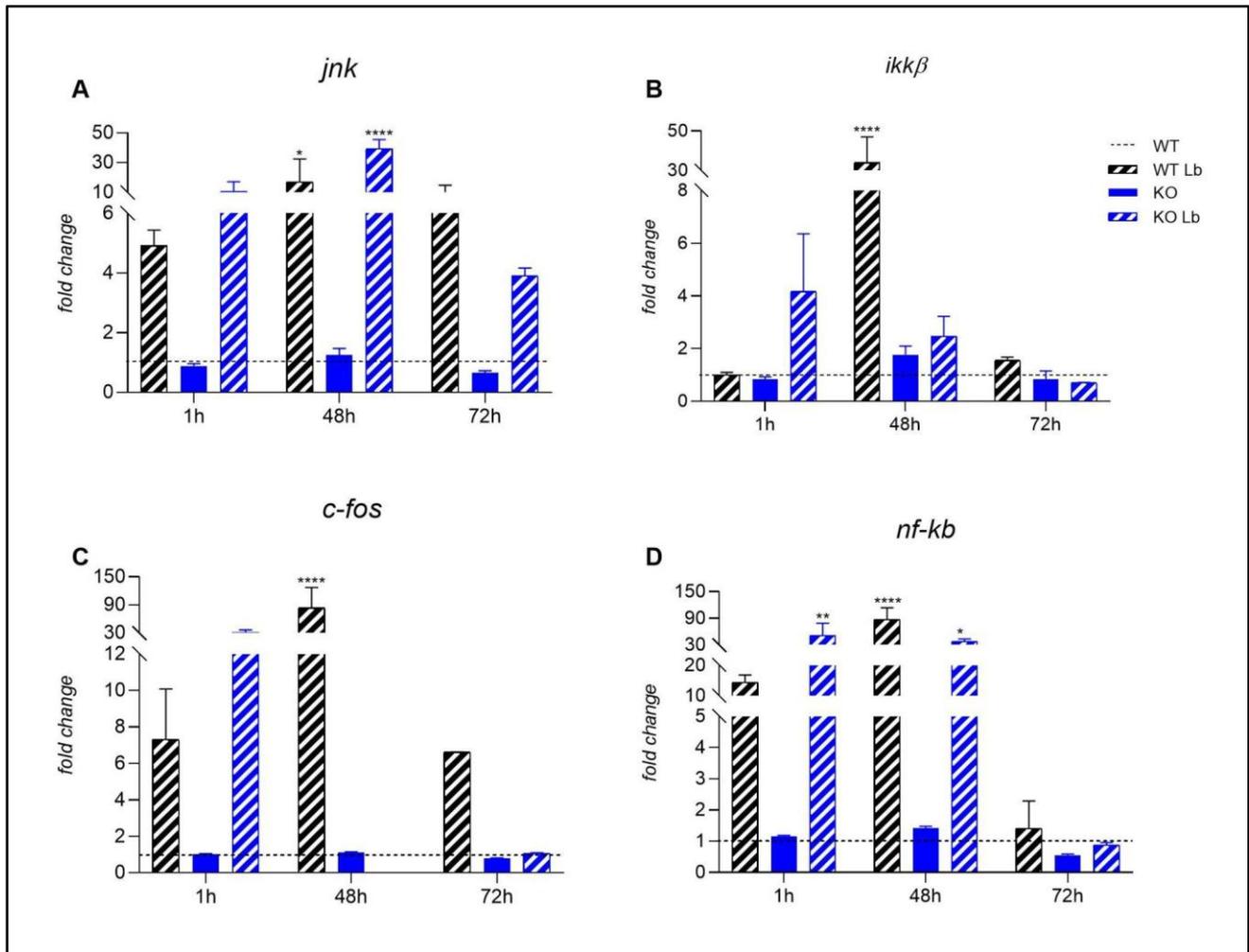


Figura 29: Gráficos de expressão de *jnk* (A), *ikkβ* (B), *c-fos* (C) e *nf-kb* (D) em macrófagos WT e KO infectados ou não com amastigotas de *L. braziliensis*. Macrófagos cultivados nas mesmas condições descritas na legenda da Figura 27. A linha pontilhada representa a expressão de macrófagos WT não infectados. A barra preta listrada representa a expressão de macrófagos WT infectados, a azul, macrófagos KO não infectados e a azul listrada, macrófagos KO infectados. Os resultados correspondem à média \pm DP de triplicata biológicas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; * $p < 0,0005$ e **** $p < 0,0001$ (teste Two-way ANOVA, Dunnett's multiple). Nas comparações para as quais não há asteriscos, a diferença não foi significativa.**

Neste contexto, parece evidente que a ausência de FABP4 impacta na resposta imune de macrófagos infectados com *L. braziliensis* através da expressão alterada de genes relacionados ao metabolismo lipídico e à resposta imune. No grupo *fabp4*-KO infectado, há uma redução da expressão dos genes *c-fos* e *lxr-α* que indica menor ativação da via inflamatória. Sabe-se que FABP4 pode ativar os fatores de transcrição NF-κB e JNK, os quais favorecem a expressão de citocinas inflamatórias. Somado a isso, FABP4 é importante na resposta macrófágica M1, logo, sua ausência associada à redução da expressão de *inos* e *il-10* reforçam sua

ação durante a polarização (MAKOWSKI et al., 2005; FURUHASHI e HOTAMISLIGIL, 2008).

Diferente da infecção por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* não sustenta sua proliferação diante do comprometimento da captação de lipídios na ausência de FABP4. Enquanto nota-se aumento de parasitos intracelulares a despeito da taxa de infecção para *L. amazonensis*, o perfil de controle da infecção por *L. braziliensis* confirma-se distinto, revelando que as diferentes espécies lidam de forma particular com o ambiente macrofágico polarizado para o perfil M2, característica atribuída à linhagem *fabp4*-KO.

Como considerações finais, salientamos que a redução dos níveis de FABP4 pode ocorrer em diversas condições fisiológicas e patológicas. Indivíduos com menor quantidade de tecido adiposo, como em estados de magreza ou lipodistrofia, tendem a apresentar menores níveis circulantes de FABP4, já que essa proteína é altamente expressa em adipócitos e também em macrófagos ativado (HOTAMISLIGIL et al., 2006; DAHLSTRÖM et al., 2021). Doenças com baixo grau de inflamação sistêmica ou disfunção imune, como certos tipos de anemia aplástica, também podem contribuir para sua diminuição. Além disso, a expressão de FABP4 pode ser modulada por fatores genéticos, como polimorfismos em seu gene, que foram associados a menor risco metabólico em algumas populações (TUNCMAN et al., 2006). Medicamentos como tiazolidinedionas (ex.: pioglitazona), que ativam o receptor PPAR γ , reduzem a expressão de FABP4 nos adipócitos, assim como estatinas, que podem suprimir sua expressão em células imunes (MAKOWSKI et al., 2005; HU et al., 2012). Dietas hipocalóricas ou anti-inflamatórias também têm sido associadas à redução indireta de FABP4, devido à melhora do perfil inflamatório e lipídico.

Com base nestes achados para *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, a FABP4 pode ter relevância biológica nas leishmanioses principalmente por seu papel regulador no metabolismo lipídico e na resposta imune inflamatória dos macrófagos, que são as células-alvo da infecção pelo parasita *Leishmania*. A ausência de FABP4 foi associada a um perfil anti-inflamatório (polarização M2) e acúmulo lipídico intracelular, sendo este um ambiente que pode favorecer a sobrevivência e replicação do parasita dentro dos macrófagos. Além disso, a ausência de FABP4 pode levar à reprogramação metabólica precoce, com aumento transitório de

metabólitos como GABA, que estão ligados ao ciclo do TCA, glicólise e lipogênese - vias metabólicas exploradas pelo parasita para obter nutrientes e evadir da resposta imune. Isso sugere que a FABP4 exerce uma função crítica no controle da ativação inflamatória, na homeostase lipídica e na adaptação metabólica inicial dos macrófagos ao parasita.

Portanto, a presença de FABP4 pode estar envolvida na contenção da disseminação do parasita via ativação imune e limitação de nutrientes lipídicos, enquanto sua ausência cria um ambiente permissivo à infecção. Isso a torna um possível alvo terapêutico ou marcador prognóstico no cenário das leishmanioses que merece ser amplamente explorado.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os dados apresentados indicam que:

- A ausência de FABP4 em macrófagos desencadeia alterações compensatórias no metabolismo lipídico e na polarização funcional, com ativação do eixo PPAR- γ /LXR- α /ABCA1 e aumento do efluxo de colesterol. Apesar da atuação parcial de FABP5 como compensador, a modulação da expressão de genes como *cd36*, *nf-kb*, *inos* e *il-10* revela uma adaptação dinâmica que afeta tanto o metabolismo quanto a resposta imune, posicionando a FABP4 como uma reguladora central dessa interface.
- Na infecção por *L. amazonensis*, macrófagos selvagens (WT) mostraram melhor controle da infecção, com ativação da via inflamatória e polarização progressiva para o fenótipo M1 em estágios avançados. Em contrapartida, a ausência de FABP4 induziu efeitos anti-inflamatórios iniciais, mas que, a longo prazo, favorecem a progressão da infecção.
- As análises metabólicas revelaram mecanismos compensatórios importantes na ausência de FABP4, como a sustentação da homeostase redox, estímulo ao efluxo de colesterol e promoção de um perfil anti-inflamatório, compatível com a polarização M2.
- A infecção *in vivo* por *L. amazonensis* resultou em lesões mais severas nos animais FABP4-KO ao longo do tempo. A análise gênica desses animais evidenciou aumento na expressão de genes relacionados à captação e ao efluxo de colesterol, além de uma tendência à resposta Th2 anti-inflamatória, que contribuiu diretamente para a piora das lesões.
- Por outro lado, na infecção por *L. braziliensis*, mesmo com o comprometimento do fluxo lipídico na ausência de FABP4, observou-se maior controle da infecção em comparação à infecção por *L. amazonensis*, indicando uma resposta diferencial entre os parasitas diante da modulação metabólica dos macrófagos.

REFERÊNCIAS

- ABBEHAUSEN, Camilla et al. Old Versus New Approaches Towards TriTryp Diseases. In: Integrated Science for Sustainable Development Goal 3: Empowering Global Wellness Initiatives. Cham: Springer Nature Switzerland, 2024. p. 187-208.
- AKHOUNDI, Mohammad et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania parasites and sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- ALCÂNTARA, Laura M. et al. Challenges in drug discovery targeting TriTryp diseases with an emphasis on leishmaniasis. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 8, n. 3, p. 430-439, 2018.
- ANDRADE-NETO, Valter Viana et al. The pharmacological inhibition of sterol biosynthesis in Leishmania is counteracted by enhancement of LDL endocytosis. *Acta tropica*, v. 119, n. 2-3, p. 194-198, 2011.
- ANDRADE-NETO, V. V. et al. Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, v. 23, p. 967, 2018.
- ANILKUMAR, Sudha; WRIGHT-JIN, Elizabeth. NF- κ B as an inducible regulator of inflammation in the central nervous system. *Cells*, v. 13, n. 6, p. 485, 2024.
- ANTOINE, Jean-Claude et al. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages. *Trends in microbiology*, v. 6, n.10, p. 392-401, 1998.
- AOKI, Juliana Ide et al. Differential immune response modulation in early Leishmania amazonensis infection of BALB/c and C57BL/6 macrophages based on transcriptome profiles. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 19841, 2019.
- ARONOFF, David M. et al. Stimulatory Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ on Fc γ Receptor-Mediated Phagocytosis by Alveolar Macrophages. *PPAR research*, v. 2007, n. 1, p. 052546, 2007.
- ARPA, Luís et al. Distinct responses to IL4 in macrophages mediated by JNK. *Cells*, v. 12, n. 8, p. 1127, 2023.
- ARRUDA, Denise C. et al. Inhibitory activity of limonene against Leishmania parasites in vitro and in vivo. *Biomedicine & pharmacotherapy*, v. 63, n. 9, p. 643-649, 2009.
- ASHAQ, Muhammad Sameer et al. The regulatory role of CD36 in hematopoiesis beyond fatty acid uptake. *Life Sciences*, v. 339, p. 122442, 2024.
- BAŞARIR SIVRI, Feyza Nur; ÇİFTÇİ, Seda. A New Insight into Fatty Acid Binding Protein 4 Mechanisms and Therapeutic Implications in Obesity-Associated Diseases: A Mini Review. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 68, n. 8, p. 2300840, 2024.

- BABAEV, Vladimir R. et al. Jnk1 deficiency in hematopoietic cells suppresses macrophage apoptosis and increases atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor null mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 36, n. 6, p. 1122-1131, 2016.
- BANDO, Yasuhiko et al. Expression and enhancement of FABP4 in septoclasts of the growth plate in FABP5-deficient mouse tibiae. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 155, p. 439-449, 2021.
- BARRAL, Aldina et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 44, n. 5, p. 536-546, 1991.
- BERVEJILLO, M. Lamas et al. A FABP4-PPAR γ signaling axis regulates human monocyte responses to electrophilic fatty acid nitroalkenes. *Redox biology*, v. 29, p. 101376, 2020.
- BOß, Marcel et al. FABP4 inhibition suppresses PPAR γ activity and VLDL-induced foam cell formation in IL-4-polarized human macrophages. *Atherosclerosis*, v. 240, n. 2, p. 424-430, 2015.
- BOSE, Ganesh Suraj et al. AP-1/C-FOS and AP-1/FRA2 differentially regulate early and late adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 125, n. 10, p. e30543, 2024.
- BOUTAGY, Nabil E. et al. Dynamic metabolism of endothelial triglycerides protects against atherosclerosis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 134, n. 4, 2024.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Nota Informativa nº 13/2020-CGZV/DEIDT/SVS/MS: uso da miltefosina nas leishmanioses no Brasil. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/julho/1/nota-informativa-13-miltefosina.pdf>. Acesso em: 21 agosto de 2024.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Nota Informativa nº 13/2020-CGZV/DEIDT/SVS/MS: uso da miltefosina nas leishmanioses no Brasil. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/arquivos/nota-informativa-no-13-2020-cgzv-deidt-svs-ms>.
- BRAZIL, Reginaldo Peçanha; RODRIGUES, Andressa A. Fuzzari; ANDRADE FILHO, José D. Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas—a mini review. *Entomology, Ornithology & Herpetology*, v. 4, n. 2, p. 1, 2015.
- BRIOSCHI, Mariana BC et al. Models for cytotoxicity screening of antileishmanial drugs: what has been done so far?. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 60, n. 2, p. 106612, 2022.

- BRUHN, Kevin W. et al. LXR deficiency confers increased protection against visceral Leishmania infection in mice. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 4, n. 11, p. e886, 2010.
- BURZA, S., CROFT, S. L., BOELAERT, M. Leishmaniasis. *The Lancet*, Sep 15;392(10151):951-970, 2018.
- CARFAGNA, Ivanna Emilce et al. Involvement of lipids from *Leishmania braziliensis* promastigotes and amastigotes in macrophage activation. *Molecular Immunology*, v. 125, p. 104-114, 2020.
- CARLINI, Valentina et al. The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. *Frontiers in immunology*, v. 14, p. 1161067, 2023.
- CECÍLIO, Pedro; CORDEIRO-DA-SILVA, Anabela; OLIVEIRA, Fabiano. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites. *Communications biology*, v. 5, n. 1, p. 305, 2022.
- CHAWLA, Ajay et al. A PPAR γ -LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Molecular cell*, v. 7, n. 1, p. 161-171, 2001.
- CHEN, Yiliang et al. CD36, a signaling receptor and fatty acid transporter that regulates immune cell metabolism and fate. *Journal of Experimental Medicine*, v. 219, n. 6, p. e20211314, 2022.
- CHEN, Xin-hai et al. Myo-inositol improves the host's ability to eliminate balofloxacin-resistant *Escherichia coli*. *Scientific reports*, v. 5, n. 1, p. 10720, 2015.
- CHU, Wen-Ming et al. JNK2 and IKK β are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity*, v. 11, n. 6, p. 721-731, 1999.
- CHUNG, Elaine Y. et al. Interleukin-10 expression in macrophages during phagocytosis of apoptotic cells is mediated by homeodomain proteins Pbx1 and Prep-1. *Immunity*, v. 27, n. 6, p. 952-964, 2007.
- CONSTANT, Stephanie L. et al. JNK1 is required for T cell-mediated immunity against *Leishmania major* infection. *The Journal of Immunology*, v. 165, n. 5, p. 2671-2676, 2000.
- COSTA, Mariana Borges et al. Relação entre a proteína transportadora de ácidos graxos tipo 4 e a biologia de vacúolos macrófagos infectados com *Leishmania*. 2020. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia.
- CUI, Chang-Yi; FERRUCCI, Luigi. Macrophages in skeletal muscle aging. *Aging (Albany NY)*, v. 12, n. 1, p. 3, 2020.
- CUNNINGHAM, Anna C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Experimental and molecular pathology*, v. 72, n. 2, p. 132-141, 2002.
- DAHLSTROEM, Emma H. et al. The low-expression variant of FABP4 is associated with cardiovascular disease in type 1 diabetes. *Diabetes*, v. 70, n. 10, p. 2391-2401, 2021.

- DE TREZ, Carl et al. iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania* major infection phase of C57/BL6 resistant mice. *PLoS pathogens*, v. 5, n. 6, p. e1000494, 2009.
- DE OLIVEIRA, Elaine Carvalho et al. Pharmacological inhibition of key metabolic pathways attenuates *Leishmania* spp infection in macrophages. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 19, n. 1, p. e0012763, 2025.
- DU, Junbao et al. An optimized method for Oil Red O staining with the salicylic acid ethanol solution. *Adipocyte*, v. 12, n. 1, p. 2179334, 2023.
- FERNANDES, Luciana R. et al. *Leishmania* major self-limited infection increases blood cholesterol and promotes atherosclerosis development. *Cholesterol*, v. 2013, n. 1, p. 754580, 2013.
- FIEHN, Oliver. Metabolomics by gas chromatography–mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. *Current protocols in molecular biology*, v. 114, n. 1, p. 30.4.1-30.4.32, 2016.
- FLORANCE, Ida; RAMASUBBU, Seenivasan. Current understanding on the role of lipids in macrophages and associated diseases. *International journal of molecular sciences*, v. 24, n. 1, p. 589, 2022.
- FLORO E SILVA, Marina et al. Macrophage Polarisation During *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Infection in Mice. *Parasite Immunology*, v. 47, n. 1, p. e70001, 2025.
- FONG, Carol Ho Yan et al. An antiinflammatory role for IKK β through the inhibition of “classical” macrophage activation. *The Journal of experimental medicine*, v. 205, n. 6, p. 1269-1276, 2008.
- FORTÉA, José Osório et al. Transcriptional signatures of BALB/c mouse macrophages housing multiplying *Leishmania amazonensis* amastigotes. *BMC genomics*, v. 10, n. 1, p. 119, 2009.
- FU, Jian et al. GABA regulates IL-1 β production in macrophages. *Cell Reports*, v. 41, n. 10, 2022.
- FURUHASHI, Masato; HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nature reviews Drug discovery*, v. 7, n. 6, p. 489-503, 2008.
- FURUHASHI, Masato et al. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature*, v. 447, n. 7147, p. 959-965, 2007.
- FURUHASHI, Masato; HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nature reviews Drug discovery*, v. 7, n. 6, p. 489-503, 2008.
- FURUHASHI, Masato et al. Lipid chaperones and metabolic inflammation. *International journal of inflammation*, v. 2011, n. 1, p. 642612, 2011.

- GARCIA, Marcus SA et al. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Trends in Parasitology*, 2024.
- GARIN-SHKOLNIK, Tali et al. FABP4 attenuates PPAR γ and adipogenesis and is inversely correlated with PPAR γ in adipose tissues. *Diabetes*, v. 63, n. 3, p. 900-911, 2014.
- GIL-DE-GÓMEZ, Luis et al. Essential role for ethanolamine plasmalogen hydrolysis in bacterial lipopolysaccharide priming of macrophages for enhanced arachidonic acid release. *Frontiers in immunology*, v. 8, p. 1251, 2017.
- GUHE, Vrushali; SINGH, Shailza. Uncovering the Significance of JNK/AKT Axis in the Autophagic Regulation of *Leishmania major* Infection. *Molecular Microbiology*, v. 123, n. 1, p. 1-15, 2025.
- GUO, Manman et al. Triggering MSR1 promotes JNK-mediated inflammation in IL-4-activated macrophages. *The EMBO journal*, v. 38, n. 11, p. e100299, 2019.
- GUO, Yuxian et al. Oxidative stress-induced FABP5 S-glutathionylation protects against acute lung injury by suppressing inflammation in macrophages. *Nature Communications*, v. 12, n. 1, p. 7094, 2021.
- GUO, Miao et al. The study on the clinical phenotype and function of HPRT1 gene. *Child Neurology Open*, v. 9, p. 2329048X221108821, 2022.
- GUPTA, Anand Kumar et al. *Leishmania donovani* inhibits inflammasome-dependent macrophage activation by exploiting the negative regulatory proteins A20 and UCP2. *The FASEB Journal*, v. 31, n. 11, p. 5087-5101, 2017.
- HAN, Xinbing et al. Interleukin-10 facilitates both cholesterol uptake and efflux in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 47, p. 32950-32958, 2009.
- HANDMAN, Emanuela. Cell biology of *Leishmania*. In: *Advances in parasitology*. Academic Press, 1999. p. 1-39.
- HART, D. T.; COOMBS, Graham H. *Leishmania mexicana*: energy metabolism of amastigotes and promastigotes. *Experimental parasitology*, v. 54, n. 3, p. 397-409, 1982.
- HE, Yulong et al. Identification of new dual FABP4/5 inhibitors based on a naphthalene-1-sulfonamide FABP4 inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 27, n. 19, p. 115015, 2019.
- HOTAMISLIGIL, Gökhan S. et al. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science*, v. 274, n. 5291, p. 1377-1379, 1996.
- HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, v. 444, n. 7121, p. 860-867, 2006.
- HOTAMISLIGIL, Gökhan S.; BERNLOHR, David A. Metabolic functions of FABPs—mechanisms and therapeutic implications. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 11, n. 10, p. 592-605, 2015.

- HOU, Yangxiao et al. FABP5 deficiency impaired macrophage inflammation by regulating AMPK/NF- κ B signaling pathway. *The Journal of Immunology*, v. 209, n. 11, p. 2181-2191, 2022.
- HU, Wenquan et al. Statins synergize dexamethasone-induced adipocyte fatty acid binding protein expression in macrophages. *Atherosclerosis*, v. 222, n. 2, p. 434-443, 2012.
- HUH, Ho Young et al. Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. 1996.
- IBRAIM, Izabela Coimbra et al. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasites & vectors*, v. 6, p. 1-11, 2013.
- INOUYE, Karen E. et al. Endothelial-derived FABP4 constitutes the majority of basal circulating hormone and regulates lipolysis-driven insulin secretion. *JCI insight*, v. 8, n. 14, p. e164642, 2023.
- JACOBO-ALBAVERA, Leonor et al. The role of the ATP-binding cassette A1 (ABCA1) in human disease. *International journal of molecular sciences*, v. 22, n. 4, p. 1593, 2021.
- JANANI, C.; KUMARI, BD Ranjitha. PPAR gamma gene—a review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, v. 9, n. 1, p. 46-50, 2015.
- JOHNSON, Gary L.; NAKAMURA, Kazuhiro. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 1773, n. 8, p. 1341-1348, 2007.
- JONES, Douglas E. et al. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infection and immunity*, v. 70, n. 4, p. 2151-2158, 2002.
- KAGAWA, Yoshiteru et al. Fatty acid-binding protein 4 is essential for the inflammatory and metabolic response of microglia to lipopolysaccharide. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, v. 18, n. 3, p. 448-461, 2023.
- KALLUNKI, Tuula et al. c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell*, v. 87, n. 5, p. 929-939, 1996.
- KANE, Margaret Mentink; MOSSER, David M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, v. 166, n. 2, p. 1141-1147, 2001.
- KAYE, P.; SCOTT, P.. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, [s.l.], v. 9, n. 8, p.604-615, 11 jul. 2011.
- KELLY, Beth; O'NEILL, Luke Aj. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell research*, v. 25, n. 7, p. 771-784, 2015.
- KIM, Jin Kyung et al. GABAergic signaling linked to autophagy enhances host protection against intracellular bacterial infections. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, p. 4184, 2018.

- KOGA, Keiko et al. Cyclic adenosine monophosphate suppresses the transcription of proinflammatory cytokines via the phosphorylated c-Fos protein. *Immunity*, v. 30, n. 3, p. 372-383, 2009.
- KUMAR, Parveen et al. Oxalate alters cellular bioenergetics, redox homeostasis, antibacterial response, and immune response in macrophages. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 694865, 2021.
- KUMAR, Parveen et al. Oxalate disrupts monocyte and macrophage cellular function via Interleukin-10 and mitochondrial reactive oxygen species (ROS) signaling. *Redox Biology*, v. 67, p. 102919, 2023.
- LAN, Hong et al. Small-molecule inhibitors of FABP4/5 ameliorate dyslipidemia but not insulin resistance in mice with diet-induced obesity. *Journal of lipid research*, v. 52, n. 4, p. 646-656, 2011.
- LAWRENCE, Toby et al. IKK α limits macrophage NF- κ B activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature*, v. 434, n. 7037, p. 1138-1143, 2005.
- LECOEUR, Herve et al. Reprogramming neutral lipid metabolism in mouse dendritic leucocytes hosting live *Leishmania amazonensis* amastigotes. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 7, n. 6, p. e2276, 2013.
- LECOEUR, Hervé et al. Targeting macrophage histone H3 modification as a leishmania strategy to dampen the NF- κ B/NLRP3-mediated inflammatory response. *Cell reports*, v. 30, n. 6, p. 1870-1882. e4, 2020.
- LECOEUR, Hervé et al. *Leishmania amazonensis* subverts the transcription factor landscape in dendritic cells to avoid inflammasome activation and stall maturation. *Frontiers in immunology*, v. 11, p. 1098, 2020.
- LEONARDI, Antonio et al. CIKS, a connection to I κ B kinase and stress-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 19, p. 10494-10499, 2000.
- LI, Andrew C. et al. Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPAR α , β/δ , and γ . *The Journal of clinical investigation*, v. 114, n. 11, p. 1564-1576, 2004.
- LI, Yankun et al. Free cholesterol-loaded macrophages are an abundant source of tumor necrosis factor- α and interleukin-6: model of NF- κ B-and map kinase-dependent inflammation in advanced atherosclerosis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 23, p. 21763-21772, 2005.
- LI, Tongxi et al. Thiamine pretreatment improves endotoxemia-related liver injury and cholestatic complications by regulating galactose metabolism and inhibiting macrophage activation. *International Immunopharmacology*, v. 108, p. 108892, 2022.

- LI, Fei et al. A multi-omics approach to reveal critical mechanisms of activator protein 1 (AP-1). *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 178, p. 117225, 2024.
- LIANG, Xiaoliang et al. Macrophage FABP4 is required for neutrophil recruitment and bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *The FASEB Journal*, v. 33, n. 3, p. 3562, 2018.
- LIU, Ting et al. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2017.
- LUKYANOVA, L. D.; KIROVA, Yu I.; GERMANOVA, E. L. The role of succinate in regulation of immediate HIF-1 α expression in hypoxia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 164, n. 3, p. 298-303, 2018.
- MAEDA, Kazuhisa et al. Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell metabolism*, v. 1, n. 2, p. 107-119, 2005.
- MAKITA, Naoyuki et al. IL-10 enhances the phenotype of M2 macrophages induced by IL-4 and confers the ability to increase eosinophil migration. *International immunology*, v. 27, n. 3, p. 131-141, 2015.
- MAKOWSKI, Liza et al. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor γ and I κ B kinase activities. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 13, p. 12888-12895, 2005.
- MCCONVILLE, Malcolm J. et al. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. *Trends in parasitology*, v. 23, n. 8, p. 368-375, 2007.
- MCCONVILLE, Malcolm J. et al. *Leishmania* carbon metabolism in the macrophage phagolysosome-feast or famine?. *F1000Research*, v. 4, n. F1000 Faculty Rev, p. 938, 2015.
- MENDES, Bruno et al. Causative agents of American tegumentary leishmaniasis are able to infect 3T3-L1 adipocytes in vitro. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, p. 824494, 2022.
- MIGUEL, Danilo C. et al. Tamoxifen is effective against *Leishmania* and induces a rapid alkalization of parasitophorous vacuoles harbouring *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 60, n. 3, p. 526-534, 2007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília, ed. 1, 191 p. 2017.
- MINORI, Karen et al. An organogold compound impairs *Leishmania amazonensis* amastigotes survival and delays lesion progression in murine cutaneous leishmaniasis: Mechanistic insights. *Biochemical Pharmacology*, v. :232, n. 116716, 2025.
- MITTRA, Bidyottam et al. Iron uptake controls the generation of *Leishmania* infective forms through regulation of ROS levels. *Journal of Experimental Medicine*, v. 210, n. 2, p.401-416, 2013.

- MURPHY, Michaela L. et al. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *European journal of immunology*, v. 31, n. 10, p. 2848-2856, 2001.
- MUTEMBEREZI, Valentin; GUILLEMOT-LEGRIS, Owein; MUCCIOLI, Giulio G. Oxysterols: From cholesterol metabolites to key mediators. *Progress in lipid research*, v. 64, p. 152-169, 2016.
- NADERER, Thomas; VINCE, James E.; MCCONVILLE, Malcolm J. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Current molecular medicine*, v. 4, n. 6, p. 649-665, 2004.
- NADERER, Thomas; MCCONVILLE, Malcolm J. The *Leishmania*–macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cellular microbiology*, v. 10, n. 2, p. 301-308, 2008.
- NANDAN, Devki; LO, Raymond; REINER, Neil E. Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-FOS and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 8, p. 4055-4063, 1999.
- NICULITE, Cristina-Mariana; ENCIU, Ana-Maria; HINESCU, Mihail Eugen. CD 36: Focus on epigenetic and post-transcriptional regulation. *Frontiers in genetics*, v. 10, p. 680, 2019.
- NOELIA, A. et al. Liver X receptors as regulators of macrophage inflammatory and metabolic pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v. 1812, n. 8, p. 982-994, 2011.
- Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2019 Disponível em: www.paho.org/leishmaniasis
- Organização Pan-Americana da Saúde. Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na Região das Américas. Segunda edição. Washington, DC: OPAS; 2022. Disponível em <https://doi.org/10.37774/9789275725030>.
- OKADA, S.; HATANO, M.; TOKUHISA, Takeshi. Suppressive role of c-fos in the iNOS expression of macrophages. *Experimental Hematology*, v. 28, n. 7, p. 120-121, 2000.
- OKUDA, Kendi et al. *Leishmania amazonensis* engages CD36 to drive parasitophorous vacuole maturation. *PLoS pathogens*, v. 12, n. 6, p. e1005669, 2016.
- OKUDA, Kendi et al. *Leishmania amazonensis* sabotages host cell SUMOylation for intracellular survival. *Iscience*, v. 25, n. 9, 2022.
- OLEKHNOVITCH, Romain; BOUSSO, Philippe. Induction, propagation, and activity of host nitric oxide: lessons from *Leishmania* infection. *Trends in parasitology*, v. 31, n. 12, p. 653-664, 2015.
- OREKHOV, Alexander N. et al. Monocyte differentiation and macrophage polarization. *Vessel Plus*, v. 3, p. N/A-N/A, 2019.

- OVALLE-BRACHO, Clemencia et al. Changes in macrophage gene expression associated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *PLoS One*, v. 10, n. 6, p. e0128934, 2015.
- PACE, David. Leishmaniasis. *Journal of Infection*, Londres, v. 69, n. 1, p. S10-S18, 2014.
- PENNATHUR, Subramaniam et al. The macrophage phagocytic receptor CD36 promotes fibrogenic pathways on removal of apoptotic cells during chronic kidney injury. *The American journal of pathology*, v. 185, n. 8, p. 2232-2245, 2015.
- PEREIRA, Luiza de Oliveira Ramos et al. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* parasite load associated with disease pathogenesis?. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 57, p. 132-137, 2017.
- PINART, Mariona et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 8, 2020.
- PRAKASH, Satya; RAI, Ambak Kumar. Retinoic acid increases cellular cholesterol in *Leishmania donovani*-infected macrophages in an mTOR-independent manner. *Microbiology Spectrum*, v. 10, n. 6, p. e02699-22, 2022.
- PRENTICE, Kacey J.; SAKSI, Jani; HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Adipokine FABP4 integrates energy stores and counterregulatory metabolic responses. *Journal of Lipid Research*, v. 60, n. 4, p. 734-740, 2019.
- Roatt, B.M., de Oliveira Cardoso, J.M., De Brito, R.C.F. et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 8965–8977 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10856-w>
- RABHI, Imen et al. Transcriptomic signature of *Leishmania* infected mice macrophages: a metabolic point of view. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 6, n. 8, p.e1763, 2012.
- RAMÍREZ, Cristina M. et al. Control of cholesterol metabolism and plasma high-density lipoprotein levels by microRNA-144. *Circulation research*, v. 112, n. 12, p. 1592-1601, 2013.
- RAY, Neelanjan et al. c-Fos suppresses systemic inflammatory response to endotoxin. *International immunology*, v. 18, n. 5, p. 671-677, 2006.
- REDDY, Raju C. Immunomodulatory role of PPAR- γ in alveolar macrophages. *Journal of Investigative Medicine*, v. 56, n. 2, p. 522-527, 2008.
- REN, Qidong et al. 2, 2', 4, 4'-Tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47) selectively stimulates proatherogenic PPAR γ signatures in human THP-1 macrophages to contribute to Foam cell formation. *Chemical Research in Toxicology*, v. 35, n. 6, p. 1023-1035, 2022.
- RIGAMONTI, Elena; CHINETTI-GBAGUIDI, Giulia; STAELS, Bart. Regulation of macrophage functions by PPAR- α , PPAR- γ , and LXRs in mice and men. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 28, n. 6, p. 1050-1059, 2008.
- RUBIO, Julio M. et al. Group V secreted phospholipase A2 is upregulated by IL-4 in human macrophages and mediates phagocytosis via hydrolysis of ethanolamine phospholipids. *The Journal of Immunology*, v. 194, n. 7, p. 3327-3339, 2015.

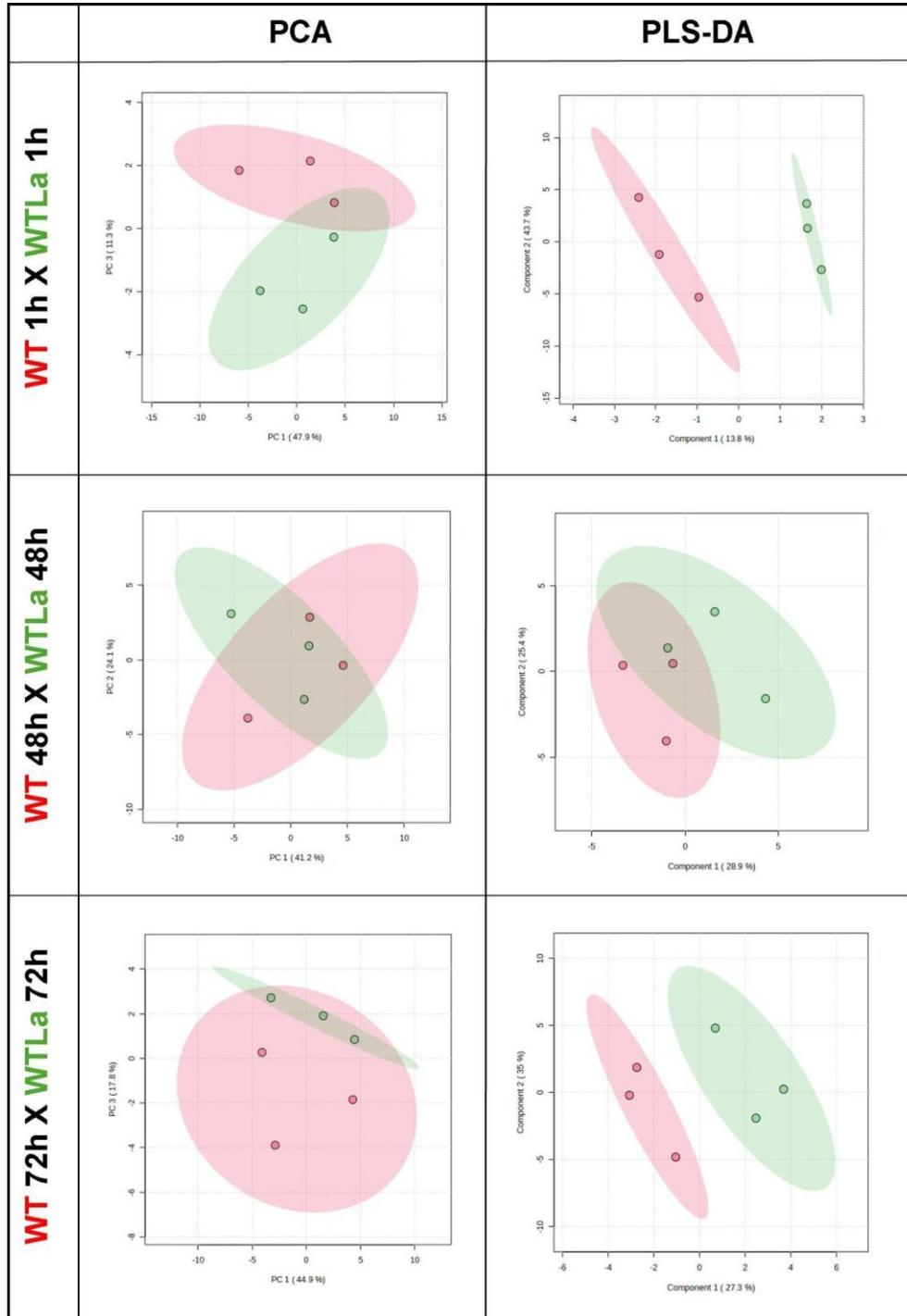
- SACKS, David; KAMHAWI, Shaden. Molecular aspects of parasite-vector and vector host interactions in leishmaniasis. *Annual reviews in microbiology*, v. 55, n. 1, p. 453-483, 2001.
- SAXTON, Robert A. et al. Structure-based decoupling of the pro-and anti-inflammatory functions of interleukin-10. *Science*, v. 371, n. 6535, p. eabc8433, 2021.
- SEGUIN, Olivier; DESCOTEAUX, Albert. VAMP3 as a negative regulator of *Leishmania amazonensis* infection and antigen cross-presentation. *The Journal of Immunology*, v. 204, n. 1_Supplement, p. 231.6-231.6, 2020.
- SEKI, Ekihiro; BRENNER, David A.; KARIN, Michael. A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches. *Gastroenterology*, v. 143, n. 2, p. 307-320, 2012.
- SEMINI, Geo et al. Changes to cholesterol trafficking in macrophages by *Leishmania* parasites infection. *Microbiologyopen*, v. 6, n. 4, p. e00469, 2017.
- SENGA, Shogo et al. Fatty acid-binding protein 5 (FABP5) promotes lipolysis of lipid droplets, de novo fatty acid (FA) synthesis and activation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1863, n. 9, p. 1057-1067, 2018.
- SHU, Lingling et al. A-FABP mediates adaptive thermogenesis by promoting intracellular activation of thyroid hormones in brown adipocytes. *Nature communications*, v. 8, n. 1, p. 14147, 2017.
- SIGMA-ALDRICH, 2007. RPMI-1640 MEDIUM (R6504) - Product Information Sheet. Missouri, EUA: Sigma-Aldrich. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/388/175/r6504pis.pdf>. Acesso em: 19 de maio de 2025.
- SILVA, Taylon Felipe et al. *Leishmania amazonensis* infection regulates oxidative stress in hyperglycemia and diabetes impairing macrophage's function and immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v. 1870, n. 4, p. 167078, 2024.
- SINHA, Mousumi et al. In-silico studies on Myo inositol-1-phosphate synthase of *Leishmania donovani* in search of anti-leishmaniasis. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 40, n. 8, p. 3371-3384, 2020.
- SO, Simon W. et al. RNAseq Analysis of FABP4 Knockout Mouse Hippocampal Transcriptome Suggests a Role for WNT/ β -Catenin in Preventing Obesity-Induced Cognitive Impairment. *International journal of molecular sciences*, v. 24, n. 4, p. 3381, 2023.
- SONG, Dandan; LIAN, Yan; ZHANG, Lin. The potential of activator protein 1 (AP-1) in cancer targeted therapy. *Frontiers in immunology*, v. 14, p. 1224892, 2023.

- SOOD, Chandni et al. Leishmania hijack host lipid body for its proliferation in macrophages by overexpressing host Rab18 and TRAPPC9 by downregulating miR-1914-3p expression. *PLoS Pathogens*, v. 20, n. 2, p. e1012024, 2024.
- SPÄTH, Gerald F. et al. The role (s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 16, p. 9536-9541, 2003.
- STEVERDING, Dietmar. The history of leishmaniasis. *Parasites & vectors*, v. 10, n.1, p. 82, 2017.
- TANG, Chongren et al. The macrophage cholesterol exporter ABCA1 functions as an anti-inflammatory receptor. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 47, p. 32336-32343, 2009.
- TANO, Fabia Tomie et al. Proteome and morphological analysis show unexpected differences between promastigotes of *Leishmania amazonensis* PH8 and LV79 strains. *PLoS One*, v. 17, n. 8, p. e0271492, 2022.
- TEIXEIRA, Mirian Vieira et al. Murine macrophages do not support the proliferation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* amastigotes even in absence of nitric oxide and presence of high arginase activity. *Parasitology Research*, v. 121, n. 10, p. 2891-2899, 2022.
- TIBÚRCIO, Rafael et al. Molecular Aspects of Dendritic Cell Activation in Leishmaniasis: An Immunobiological View. *Frontiers in immunology*, v. 10, 2019.
- TOMIOTTO-PELLISSIER, Fernanda et al. Murine susceptibility to *Leishmania amazonensis* Infection is influenced by arginase-1 and macrophages at the lesion site. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, p. 687633, 2021.
- TRINH, Michael N. et al. Last step in the path of LDL cholesterol from lysosome to plasma membrane to ER is governed by phosphatidylserine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 117, n. 31, p. 18521-18529, 2020.
- TUNCMAN, G. et al. A genetic variant at the fatty acid-binding protein aP2 locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 18, p. 6970-6975, 2006.
- VELASQUEZ, Leonardo G. et al. Distinct courses of infection with *Leishmania (L.) amazonensis* are observed in BALB/c, BALB/c nude and C57BL/6 mice. *Parasitology*, v. 143, n. 6, p. 692-703, 2016.
- VENKATESWARAN, Asha et al. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 22, p. 12097-12102, 2000.
- VILLAS-BÔAS, Silas Granato et al. Metabolome analysis by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Review*, v. 24, n. 5, p. 613-646, 2005.
- VOGEL, Andrea et al. Lipid scavenging macrophages and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1867, n. 1, p. 159066, 2022.

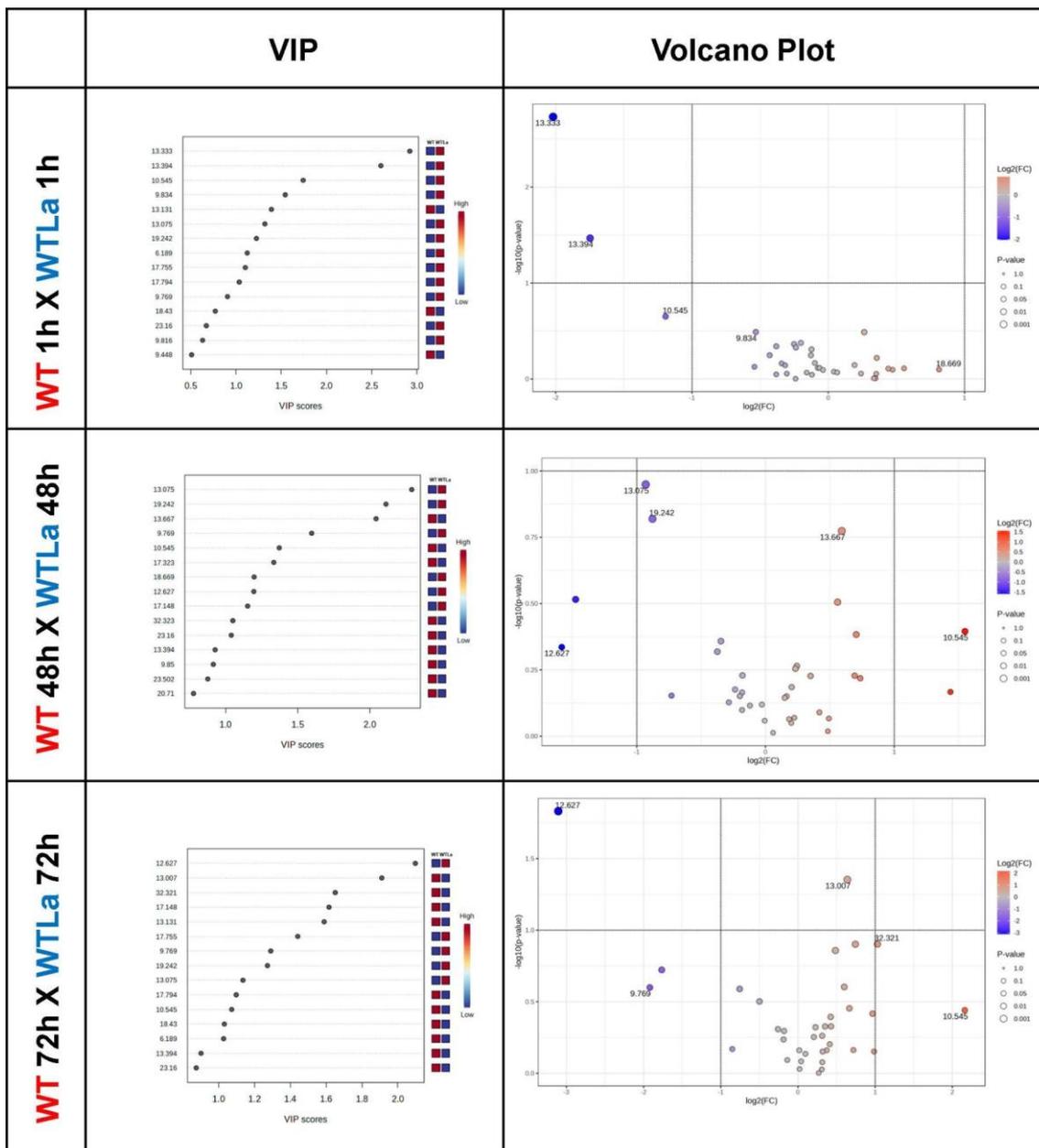
- WELLINGTON, Cheryl L. et al. ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Laboratory investigation*, v. 82, n. 3, p. 273-283, 2002.
- WILLIAMS, Niamh C.; O'NEILL, Luke AJ. A role for the Krebs cycle intermediate citrate in metabolic reprogramming in innate immunity and inflammation. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 141, 2018.
- WILLS, Rachel C.; HAMMOND, Gerald RV. PI (4, 5) P2: signaling the plasma membrane. *Biochemical Journal*, v. 479, n. 21, p. 2311-2325, 2022.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. World Health Organization, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 15 agosto de. 2024.
- XU, Lingbo et al. FABP4 activates the JAK2/STAT2 pathway via Rap1a in the homocysteine-induced macrophage inflammatory response in ApoE^{-/-} mice atherosclerosis. *Laboratory Investigation*, v. 102, n. 1, p. 25-37, 2022.
- YAN, Jiawei; HORNG, Tiffany. Lipid metabolism in regulation of macrophage functions. *Trends in cell biology*, v. 30, n. 12, p. 979-989, 2020.
- YANG, Ying et al. GABA and topiramate inhibit the formation of human macrophage-derived foam cells by modulating cholesterol-metabolism-associated molecules. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 33, n. 4, p. 1117-1129, 2014.
- YANG, An-Ning et al. High-methionine diets accelerate atherosclerosis by HHcy-mediated FABP4 gene demethylation pathway via DNMT1 in ApoE^{-/-} mice. *FEBS letters*, v. 589, n. 24, p. 3998-4009, 2015.
- YOREK, Matthew et al. FABP4-mediated lipid accumulation and lipolysis in tumor-associated macrophages promote breast cancer metastasis. *Elife*, v. 13, p. RP101221, 2024.
- ZHANG, Juan et al. I κ B kinase β (IKK β): Structure, transduction mechanism, biological function, and discovery of its inhibitors. *International journal of biological sciences*, v. 19, n. 13, p. 4181, 2023.
- ZHAO, Lin et al. The roles of liver X receptor α in inflammation and inflammation-associated diseases. *Journal of cellular physiology*, v. 236, n. 7, p. 4807-4828, 2021.

ANEXO A

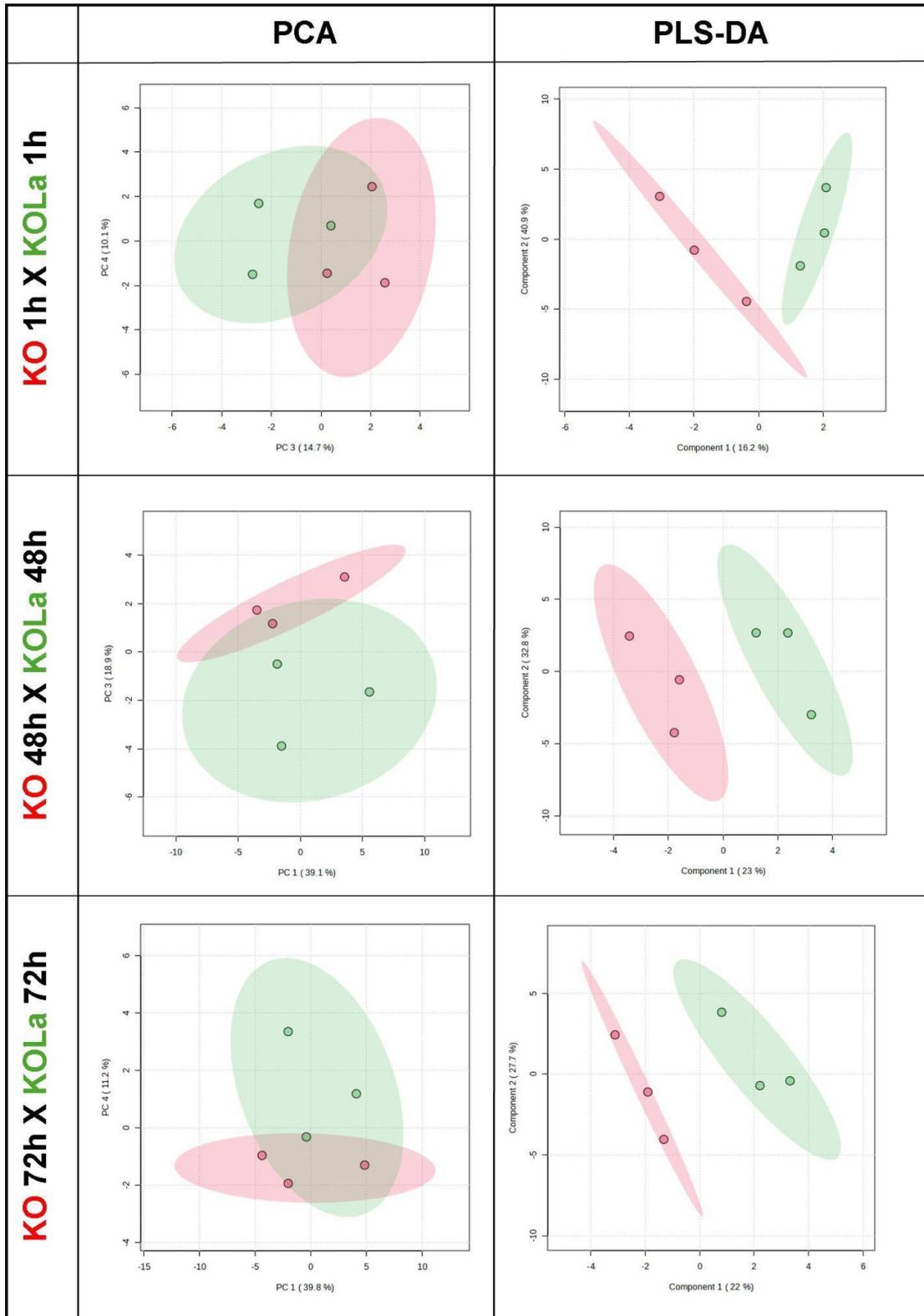
Gráficos de PCA e PLS-DA referente às comparações dos grupos infectados.



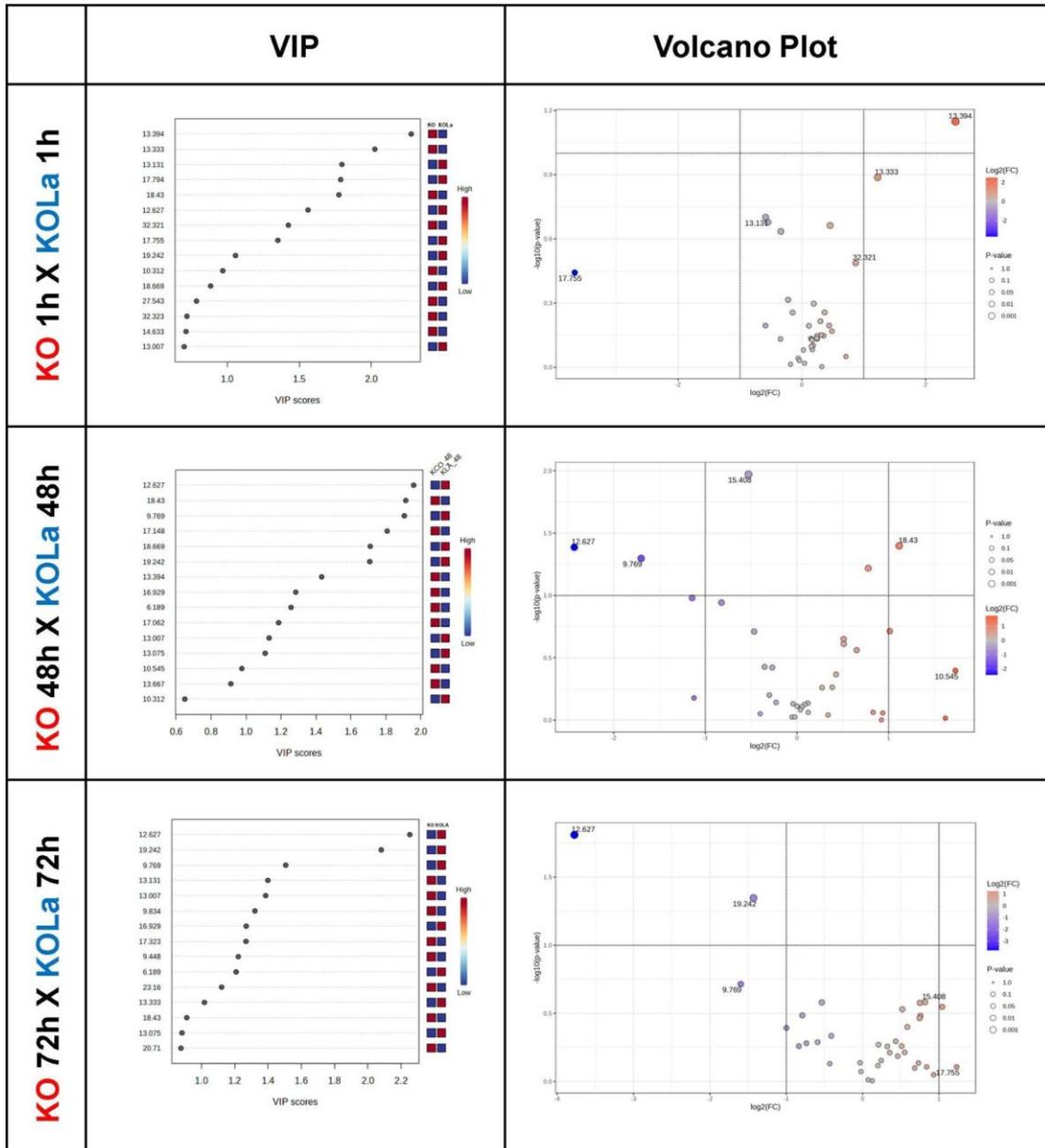
Análise multivariada por PCA e PLS-DA dos metabólitos referentes aos grupos de macrófagos WT não infectados e infectados com *L. amazonensis* (WTLa). As fileiras representam os grupos representados em diferentes tempos (1, 48 e 72h), sendo em vermelho, os pontos referentes ao grupo WT não infectado e, em verde, ao grupo WT infectado.



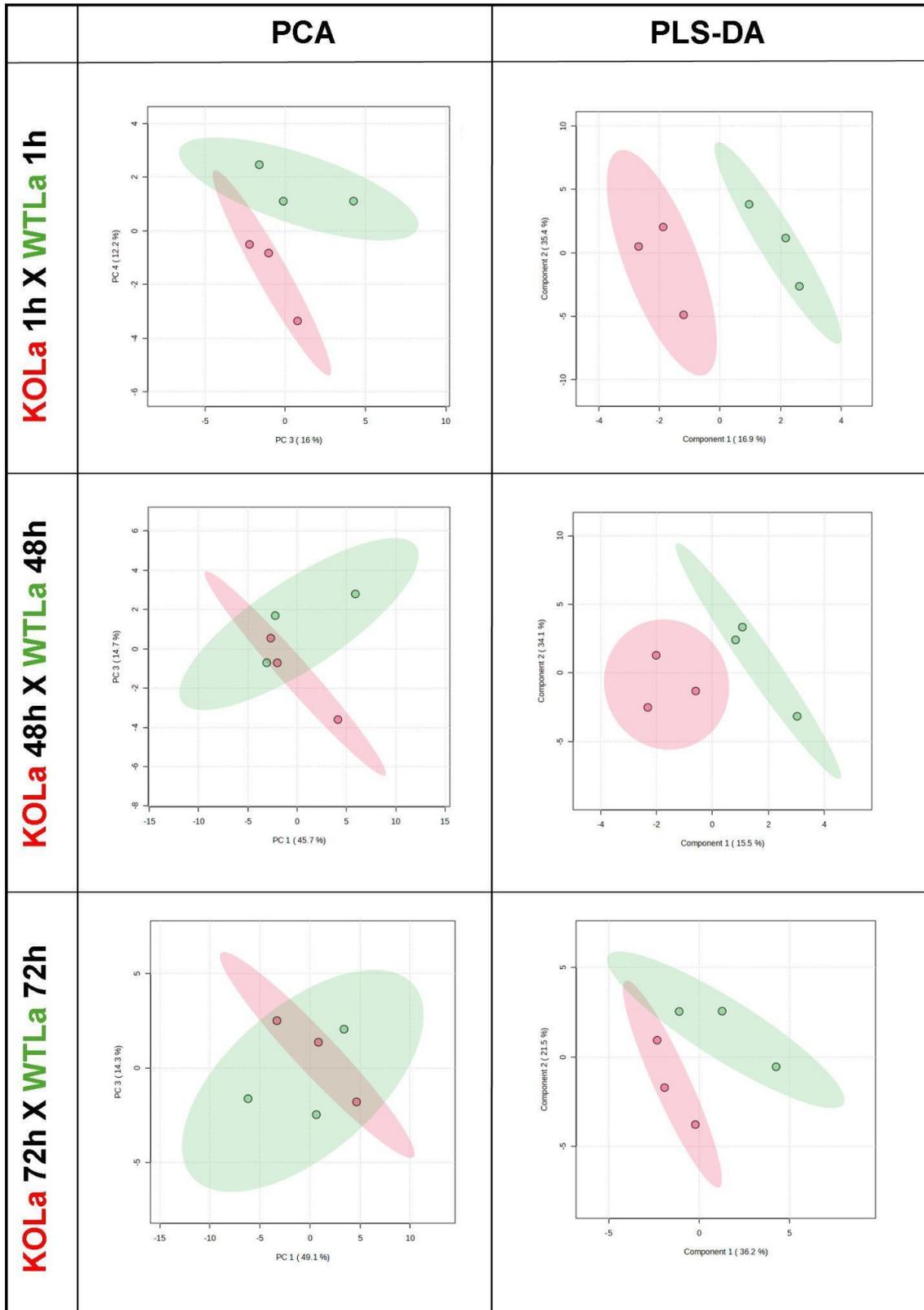
Gráficos de VIP score e Volcano Plot dos metabólitos anotados de macrófagos WT não infectados e infectados com *L. amazonensis* (WTLa). As fileiras representam os grupos nos diferentes tempos, sendo em vermelho o grupo WT e em azul, o grupo WTLa. Na primeira coluna estão os gráficos de VIP score sendo cada ponto um metabólito anotado acompanhado de *heatmap* para WT e WTLa. Coluna da direita: *Volcano plots* dos metabólitos anotados.



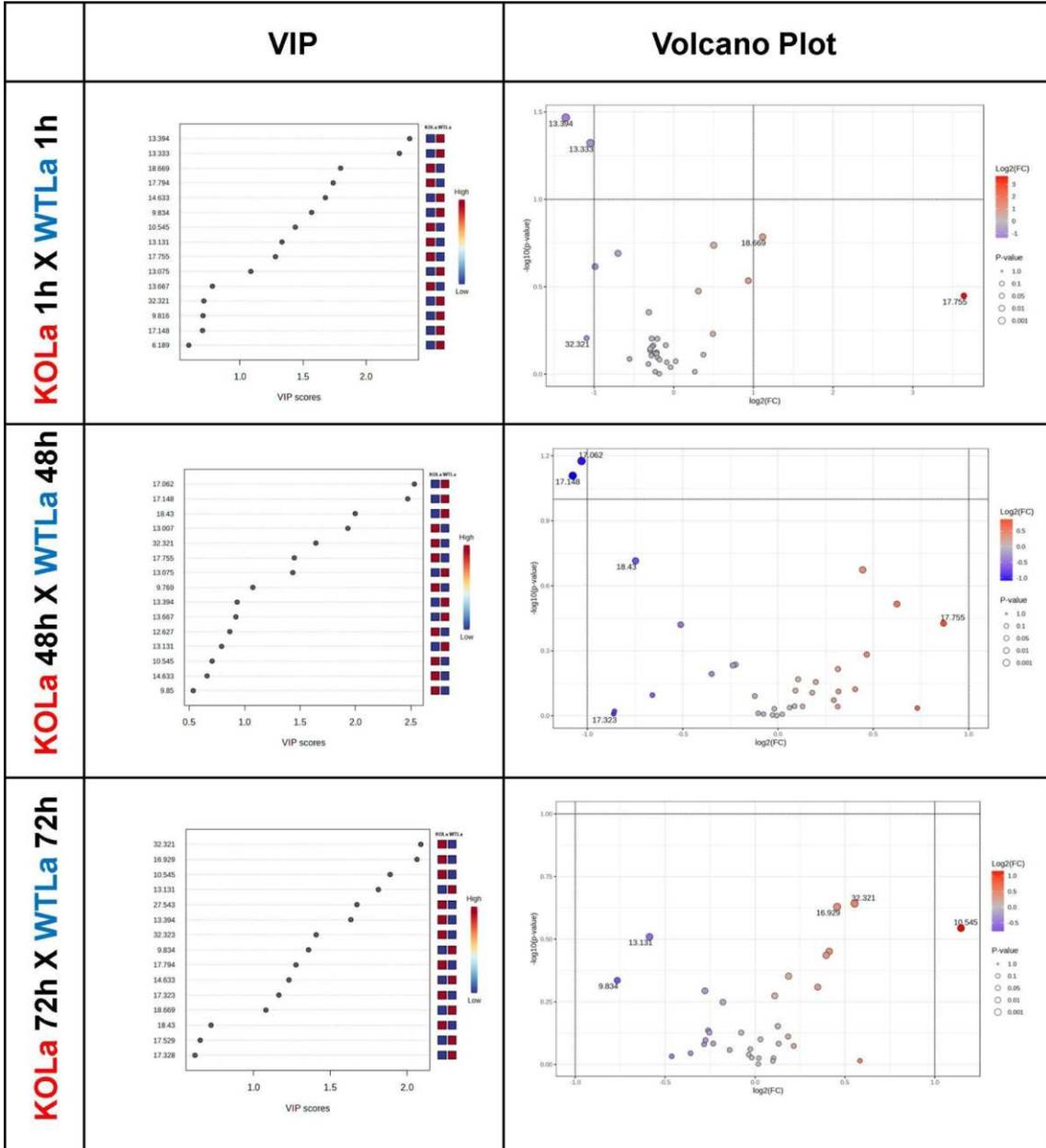
Análise multivariada por PCA e PLS-DA dos metabólitos referentes aos grupos de macrófagos *fabp4*-KO (KO) não infectados e infectados com *L. amazonensis* (KOLa). As fileiras representam os grupos representados em diferentes tempos (1, 48 e 72h), sendo em vermelho, os pontos referentes ao grupo KO não infectado e, em verde, ao grupo KO infectado.



Gráficos de VIP score e Volcano Plot dos metabólitos anotados de macrófagos *fabp4*-KO (KO) não infectados e infectados com *L. amazonensis* (KOLa). As fileiras representam os grupos nos diferentes tempos, sendo em vermelho o grupo KO e em azul, o grupo KOLa. Na primeira coluna estão os gráficos de VIP score sendo cada ponto um metabólito anotado acompanhado de *heatmap* para KO e KOLa. Coluna da direita: *Volcano plots* dos metabólitos anotados.



Análise multivariada por PCA e PLS-DA dos metabólitos referentes aos grupos de macrófagos WT e *fabp4*-KO infectados com *L. amazonensis* (WTLa e KOLa). As fileiras representam os grupos representados em diferentes tempos (1, 48 e 72h), sendo em vermelho, os pontos referentes ao grupo KOLa e, em verde, ao grupo WTLa.



Gráficos de VIP score e Volcano Plot dos metabólitos anotados de macrófagos WT e *fabp4*-KO infectados com *L. amazonensis* (WTLa e KOLa). As fileiras representam os grupos nos diferentes tempos, sendo em vermelho o grupo KOLa e em azul, o grupo WTLa. Na primeira coluna estão os gráficos de VIP score sendo cada ponto um metabólito anotado acompanhado de *heatmap* para KOLa e WTLa. Coluna da direita: *Volcano plots* dos metabólitos anotados.

ANEXO B



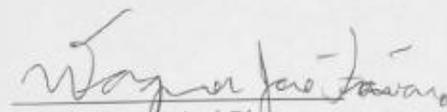
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Da entrada dos ácidos graxos ao efluxo de colesterol: proteínas moduladas durante a infecção por espécies de Leishmania**, registrada com o nº **5476-1/2020**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel e Mariana Borges Costa**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais; do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **20/02/2020**.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	02/03/2020 a 02/03/2023
Vigência da autorização para manipulação animal:	20/02/2020 a 02/03/2023
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	27
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 23.00 Gramas
Sexo:	27 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6J - aP2-/-
No. de animais:	27
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 23.00 Gramas
Sexo:	27 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	15
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 23.00 Gramas
Sexo:	15 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6J - aP2-/-
No. de animais:	15
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 23.00 Gramas
Sexo:	15 Fêmeas
Origem:	Sabri Ülker Center, Laboratory of Dr. Gökhan Hotamışligil Dept. of Genetics and Complex Diseases
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério do Laboratório de Doenças Tropicais, IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **18 de março de 2020**.


 Prof. Dr. Wagner José Fávares
 Presidente


 Rosângela dos Santos
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO C

CERTIFICADO CEUA nº 168/2023



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Da entrada dos ácidos graxos ao efluxo de colesterol: proteínas moduladas durante a infecção por espécies de Leishmania** registrada com o nº **6293-1/2023**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel e Mariana Borges Costa**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **16/08/2023**.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/08/2023 a 01/08/2025
Vigência da autorização para manipulação animal:	16/08/2023 a 01/08/2025
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	5
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 23.00 Gramas
Sexo:	5 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6J - aP2-/-
No. de animais:	5
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 23.00 Gramas
Sexo:	5 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	5
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 23.00 Gramas
Sexo:	5 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6J - aP2-/-
No. de animais:	5
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 23.00 Gramas
Sexo:	5 Fêmeas
Origem:	Sabri Ülker Center, Laboratory of Dr. Gökhan Hotamisligil Dept. of Genetics and Complex Diseases

CERTIFICADO CEUA nº 169/2023

Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério do Laboratório de Doenças Tropicas, IB/UNICAMP
---	---

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao IBAMA, SIBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **22 de agosto de 2023.**

 Profa. Dra. Cinthia Baú Betim Cazarin
 Vice-presidente da CEUA/Unicamp

 Eduardo Villaverde Haszler
 Secretário Executivo

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado eletronicamente por **CÍNTIA BAÚ BETIM CAZARIN, VICE-PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 22/08/2023, às 14:42 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **EDUARDO VILLAVERDE HASZLER, SECRETÁRIO EXECUTIVO DA CEUA/UNICAMP**, em 22/08/2023, às 11:23 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site: sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador: **A12F5259 111649B0 B8F72A62 5595DA8E**



ANEXO D



Of. CIBio/IB 02/2019

Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
06 de dezembro de 2019.

Prof. Dr. DANILO CICCONE MIGUEL
Departamento de Biologia Animal
Instituto de Biologia
UNICAMP

Prezado Professor:

Informamos que o projeto CIBio 2019/06 – **THE ROLE OF FATTY ACID-BINDING PROTEINS IN THE MACROPHAGE INFECTION BY LEISHMANIA: A POTENTIAL TARGET FOR NEW DRUGS AGAINST LEISHMANIASIS**, sob sua responsabilidade, envolvendo OGM do tipo I, foi aprovado pela CIBio-IB/Unicamp para ser desenvolvido nas dependências do **Laboratório de Imunoparasitologia Experimental - Prédio de Doenças Tropicais - Instituto de Biologia - UNICAMP - Biotério do Laboratório de Doenças Tropicais, IB/UNICAMP**, nível de biossegurança 1:

Transcrição do parecer:**Instalações usadas no projeto**

Laboratório de Imunoparasitologia Experimental - Prédio de Doenças Tropicais - Instituto de Biologia - UNICAMP - Biotério do Laboratório de Doenças Tropicais, IB/UNICAMP, credenciado junto a CIBio/IB/UNICAMP.

OGMs

Nome científico do OGM: *Mus musculus* aP2-/- infectado com *Leishmania*, C57BL/6 background

Nome comum do OGM: camundongo C57BL/6 com o gene FABP4 deletado em macrófagos infectado com *Leishmania*

Parecer

- O título é suficientemente amplo para abranger vários sub-projetos? Sim
- Quais os objetivos do projeto? O projeto tem por objetivo determinar se diferentes espécies de *Leishmania* de importância epidemiológica para o Brasil são capazes de modular a atividade da proteína ligadora de ácido graxo do tipo 4 (FABP4) das células hospedeiras, como uma estratégia de adaptação para garantir acesso a nutrientes e assim, a sua sobrevivência.

- Todos os documentos foram apresentados? (Projeto de pesquisa completo, Croqui do laboratório e biotérios, Manual de Biossegurança do Laboratório de acordo com check-list da CIBio) Sim e estão de acordo com as normas da CIBio

- O formulário eletrônico está preenchido integralmente? Sim e as informações citadas estão de acordo com as normas da CIBio.

Data da visita: 23/10/19

Recomendação: aprovar sem ressalvas

Recomendamos que sejam observadas as instruções normativas referentes transporte e contenção da OGMs, disponíveis na webpage da CTNBio <www.ctnbio.gov.br>.

Informamos que toda documentação impressa e assinada deve ser entregue na Secretaria da CIBio, assim como deve estar disponível para futuras visitas/inspeções pela CIBio/IB-UNICAMP e pelos órgãos externos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Luiz Proença Modena
Presidente da CIBio/Instituto de Biologia – UNICAMP

Cópia: Chefe do DBA/IB/UNICAMP: Prof. Dr. Luís Felipe de Toledo Ramos Pereira

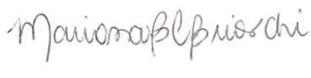
CIBio/IB-Unicamp
Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - Unicamp
Caixa Postal 6109 - 13063-970 Campinas SP
Tel.: (19) 3521-6359 - e-mail: comibio@unicamp.br

ANEXO E

Declaração

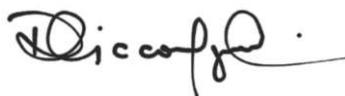
As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Tese de Doutorado, intitulada “**Da entrada de ácidos graxos ao efluxo de colesterol: proteínas moduladas na infecção por espécies de *Leishmania***”, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 13 de agosto de 2025

Assinatura: 

Nome da autora: Mariana Borges Costa Brioschi

RG n.º 439812367

Assinatura: 

Nome do orientador: Danilo Ciccone Miguel

RG n.º 27895647